

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'État)

PAR

René-Maurice BABIN

PHARMACIEN.

LICENCIÉ ÈS SCIENCES.

CHARGÉ DE COURS A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX.

AGRÉGÉ DU SERVICE DE SANTÉ DE LA MARINE.

PROFESSEUR A L'ÉCOLE PRINCIPALE DU SERVICE DE SANTÉ DE LA MARINE ET DES TROUPES COLONIALES.

1^{re} Thèse. — LA PAPAÏNE : ACTION ENZYMATIQUE, SON RÔLE DANS LA CROISSANCE ET L'INHIBITION MICROBIENNES.

2^e Thèse. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Présentées et soutenues publiquement le 21 Décembre 1953, devant la Commission d'Examen.

MM. MESNARD, professeur... .. *Président*

VITTE, professeur.....	}	<i>Juges</i>
TAYEAU, professeur.....		
CHELLE, Doyen Honoraire.....		

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'État)

PAR

René-Maurice BABIN

PHARMACIEN.

LICENCIÉ ÈS SCIENCES.

CHARGÉ DE COURS A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX.

AGRÉGÉ DU SERVICE DE SANTÉ DE LA MARINE.

PROFESSEUR A L'ÉCOLE PRINCIPALE DU SERVICE DE SANTÉ DE LA MARINE ET DES TROUPES COLONIALES.

1^{re} Thèse. — LA PAPAÏNE : ACTION ENZYMATIQUE, SON RÔLE DANS LA CROISSANCE ET L'INHIBITION MICROBIENNES.

2^e Thèse. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Présentées et soutenues publiquement le 21 Décembre 1953, devant la Commission d'Examen.

MM. MESNARD, professeur.. *Président*

VITTE, professeur.....
TAYEAU, professeur.....
CHELLE, Doyen Honoraire.....

} *Juges*



LA PAPAINE
ACTION ENZYMATIQUE
SON ROLE DANS LA CROISSANCE
ET L'INHIBITION MICROBIENNES



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552428_0046

I N T R O D U C T I O N

La somme des travaux concernant la papaïne, ou papaïnase, du latex épaissi de *CARICA PAPAYA* L, Papayacées, se rapporte principalement à l'hydrolyse des protides. Si leur importance semble à première vue rendre inutile une nouvelle contribution, il nous est apparu nécessaire, malgré le nombre impressionnant des documents publiés, d'apporter quelques précisions sur les processus de l'hydrolyse et la mesure de l'activité enzymatique.

Mais le rôle de la papaïne ne se borne pas uniquement à celui d'un ferment. Depuis longtemps, selon ASTRUC (3), on l'utilise pour détruire les fausses membranes et VELLUZ (108), en 1938, rapporte l'inactivation sous son influence de quelques toxines, notamment la toxine diphtérique. Des constatations cliniques nous conduisirent en 1949, en collaboration avec RIGAUD et BRISOU, à publier (5), (6), (92), la mise en évidence des propriétés antibiotiques de l'enzyme.

Notre travail comporte donc deux parties: la première est consacrée à l'étude de l'action protidolytique, la seconde montre la papaïne sous un nouvel aspect, mettant en évidence son action sur la croissance des microbes et la dualité de ses effets selon qu'il s'agisse d'aérobies vis-à-vis desquels elle se comporte en général comme antibiotique, ou d'anaérobies dont elle favorise, au contraire, la croissance.

PREMIERE PARTIE

LA PAPAINE-ENZYME



Chapitre I

HISTORIQUE

Connu des Indigènes des régions tropicales qui, depuis des temps très reculés, l'utilisent pour rendre comestible le gibier abattu après des chasses prolongées, le suc du papayer est décrit dans les premiers récits des navigateurs revenant des Indes Occidentales. C'est, semble-t-il, HUGUES, dans son Histoire des Barbades (54), qui note, vers 1750, l'existence dans ce suc d'une matière active telle que le simple contact du fruit vert avec la viande la plus dure la rend rapidement tendre, même à froid; à l'ébullition, le phénomène s'observe au bout de quelques instants.

VAUQUELIN, en 1802 (107), étudie avec un suc de papayer de l'Ile Maurice, le "principe" capable d'agir sur la matière vivante; mais il faut attendre WITTMARCK, en 1878 (114), pour qu'il soit à nouveau question du ferment soluble doué de la propriété de digérer les albuminoïdes.

L'année suivante, F. WÜRTZ et BOUCHUT (119) isolent du latex blanc et épais du fruit encore vert de l'"arbre à melons" des Anglo-Saxons le ferment qu'ils baptisent "papaine". A peu près en même temps, PECKOLT (79) extrait un produit similaire qu'il appelle la "papayotine". L'un et l'autre seraient, d'après ceux qui les ont extraits, une véritable "pepsine végétale" qui dissout, disent-ils, "l'albumine et la fibrine dans les solutions neutres, acides ou alcalines, en les peptonisant".

En 1880, TROUETTE-PERRET (104) présente une thèse intitulée "Les Propriétés Thérapeutiques et Chimiques du Suc Laiteux de Papayer" qui devait conférer à son auteur une belle notoriété dans l'exploitation ultérieure de la papaine.

En 1883, CHEVALY (26), puis, en 1884, ROBERT (93) comparent l'action de la papaine à celle de la pepsine (dont on sait que l'optimum se situe en milieu chlorhydrique dilué) et à celle de la pancréatine (agissant surtout en milieu alcalin).

Au début de ce siècle, KILMER (59) retrace une histoire du papayer, tandis qu'en 1906, FERNBACH (37) étudie l'influence de la réaction du milieu sur l'action des diastases en général et de la papaïne en particulier.

Le Codex de 1908 ne mentionne toutefois pas cet enzyme.

POZERSKI, la même année (87), reprenant les observations de HUGUES et celles de WURTZ, mentionne dans sa thèse de doctorat-ès-Sciences, un phénomène de digestion brusque par la papaïne, ainsi qu'une expérimentation sur l'immunisation des animaux par l'enzyme, tandis que JAVILLIER (58), dans sa thèse d'agrégation de 1909, traite également de la papaïne et des ferments protéolytiques ainsi que des produits pharmaceutiques qui dérivent de leurs actions.

Les premières expériences d'activation et d'inhibition de l'enzyme datent de 1903 avec S.H. VINES (109), mais ce sont principalement MENDEL et BLOOD (74) qui signalent les premiers l'activation de la diastase par l'acide cyanhydrique et les dérivés sulphydrylés comme particularité de la papaïne.

En 1911, la thèse de Pharmacie de CHOAY (27), résume pour l'époque tout ce que l'on sait sur son mode d'action.

Deux ans plus tard, EFFRONT (34) étudiant les catalyseurs biochimiques dans la vie et dans l'industrie, cite pour la première fois l'existence, à côté de l'enzyme d'un antienzyme, l'antipapaïne sur laquelle il ne peut que donner les renseignements accessibles à cette époque.

FRANKEL, en 1917 (41), donne une revue des facteurs influençant l'activité protéolytique de l'enzyme.

Tous ces travaux, sauf ceux de MENDEL et BLOOD, n'apportent pas de précisions bien intéressantes sur la nature et le mode d'action de l'enzyme.

Il faut arriver à l'étude d'ensemble de FLEURY, en 1924 (38), pour trouver l'influence des différents facteurs conditionnant la protidolyse: optimum thermique, optimum de pH, rôle des activateurs minéraux, variation de la vitesse d'hydrolyse et de l'optimum des pH selon les concentrations relatives d'enzyme et de substrat, autrement dit importance capitale du rapport $\frac{S}{E}$ dont l'extrême variabilité quant aux résultats obtenus est parfaitement exposée.

L'auteur reprend, entre autres travaux, ceux de G. BERTRAND, relative à l'optimum d'action de la laccase qui varie fortement selon la concentration en gallacol pour une concentration constante d'enzyme. Avec 6,25 mg de gallacol, le pH optimum est de 8,4, tandis qu'il passe à 6,7 avec 100 mg.

La même année, WILSTÄTTER et GRASSMANN (111) mesurent l'activation de l'enzyme par l'acide cyanhydrique, déjà signalée dès 1910 par MENDEL et BLOOD.

En 1925, FABRE ET FROSSARD (36) précisent l'influence de la réaction du milieu sur l'hydrolyse papaïnique. La méthode de ces auteurs consiste à suivre l'hydrolyse de la fibrine de porc par pesée d'extraits secs et

par la formol-titration en milieux de pH tamponnés aux phosphates. Leur conclusion est formelle "le maximum d'action de ce ferment a lieu en milieu neutre; une légère acidité de même qu'une faible alcalinité diminuent notablement l'activité diastasique. "Il est dommage que ces auteurs n'aient suivi l'hydrolyse que d'un seul substrat.

Poursuivant les recherches de WILLSTAETTER, KRAUT et BAUER (61) s'efforcent, en 1926, de concentrer l'enzyme dans ses solutions par adsorption sur alumine, comme le feront à nouveau, dix ans plus tard, BALLS et ses collaborateurs.

En 1932, SUMNER, KIRK, HOWELL (102) obtiennent la digestion d'un enzyme, l'uréase, par un autre enzyme, la papaïne, résultat qui aboutira, vingt ans plus tard, à lutter contre les pénicillinas.

En 1935, BERSIN (16) ajoute à la liste des activateurs connus de l'enzyme (cyanures, acide sulfhydrique, cystéine et glutathion) l'acide ascorbique. A cette époque, les inhibiteurs sont au contraire des oxydants (peroxydes, oxygène, iode, ferricyanures, iodacétates et de nombreux agents d'oxydation.)

Cette même année, BERGMANN, ZERVAS et FRUTON (15) se préoccupent de la spécificité de l'action enzymatique de la papaïne à laquelle ils fixent l'optimum d'action à pH = 5 et non à 7 comme l'avaient affirmé FABRE et FROSSARD. De plus, étudiant l'hydrolyse de substrats synthétiques, ils précisent que celui qui s'hydrolyse le plus complètement est la benzoyl-glycinamide, tandis que si l'enzyme est activé par l'acide cyanhydrique, c'est la benzoylglycyl-l-leucylglycine.

BASU et NATH (13) reconnaissent, en 1936, le glutathion comme activateur naturel du latex du papayer et à peu près en même temps, BERGMANN et ROSS (14) annoncent qu'ils peuvent différencier une papaïne-I et une papaïne-II peut être voisine de la "chymopapaïne" citée dans les ouvrages anglo-saxons.

En 1937, tandis que la nouvelle pharmacopée française inclut, cette fois-ci, la papaïne qu'elle définit comme le "latex épaissi obtenu par incision un peu avant la maturité des fruits de CARICA PAPAYA L", BALLS, LINEWEAVER et THOMPSON (12) signalent, après les échecs de KUNITZ, de NORTHROP et de WILLSTAETTER, avoir obtenu l'enzyme cristallisé.

Deux années plus tard, ces mêmes auteurs décrivent en détail le mode opératoire qu'ils ont suivi, indiquent un poids moléculaire de 27 à 30.000 et présentent les deux formes cristallines isolées: l'une en aiguilles fines, l'autre en tablettes hexagonales, sans aucune indication cristallographique plus précise, la forme d'aiguilles fines, que nous avons nous-même obtenue, ne permet d'ailleurs pas de les rattacher formellement à tel ou tel système cristallin.

Malgré l'importance de cette découverte, il ne semble pas que les travaux ultérieurs aient été repris à l'aide de cette papaïne cristallisée, en raison sans doute du faible rendement et de la difficulté de conserver l'activité protidolytique.

Si VELLUZ (108) rapporte en 1938 l'inactivation de quelques toxines

par l'enzyme, notamment la toxine diphtérique, sans faire intervenir l'action antibiotique sur laquelle nous reviendrons ultérieurement, POPE (85), en 1939) prépare une antitoxine diphtérique par digestion papainique de bacilles diphtériques équinés.

La notion de la coexistence de plusieurs enzymes est reprise en 1941 par JANSSEN et BALLS (56) qui utilisent le test de la vitesse de coagulation du lait, et différencient ainsi une "chymopapaine" de poids moléculaire de 45.000, plus active que la papaine ordinaire, tandis que IRVINE, FRUTON et BERGMANN (55) différencient deux papaines α et β , la papaine α n'étant pas activée par l'acide cyanhydrique, au contraire de la papaine β . La papaine α peut se transformer en β par action des composés sulfhydrylés.

Pour ces auteurs, on aurait :

α papaine (oxydée) $\rightleftharpoons$ β papaine (réduite)
la réduction $\rightarrow$ ayant lieu pas l'acide sulfhydrique.

β papaine + coenzyme $\rightleftharpoons$ β papaine à forte activité protidolytique.

Les rapports d'activité des divers coenzymes étant de :

0,12 pour l'acide sulfhydrique,
0,38 pour la cystéine et le glutathion,
0,30 pour l'acide cyanhydrique.

Remarquons en passant, que les auteurs emploient indifféremment les expressions d'activateurs et de coenzymes pour les dérivés cités.

Selon BERGMANN, la papaine hydrolyse les oligopeptides et même les dipeptides.

En 1943 et 1944, ROCHE et MOURGUE (95) démontrent que la papaine libère de la leucine et de la valine par hydrolyse de divers protéides.

En 1946, TAYEAU et BUFFE (103) libèrent du cholestérol par action de la papaine sur les protéines du sérum, parvenant ainsi à rompre les liaisons lipido-protéidiques.

En 1947, HOOVER et KOKES (52) reprennent l'étude une fois de plus sous le titre "action du pH sur la protéolyse par la papaine".

Ils utilisent la caséine et montrent que l'hydrolyse atteint 50 p.100 à pH = 5 et 25 p.100 seulement à pH = 7, l'action étant peptidasique à pH = 5 tandis qu'elle est simplement protéinasique à pH = 7.

Dans un autre domaine, HOUSEWRIGHT et HENRY (53) montrent la destruction par la papaine de l'endopénicilline d'*Escherischia Coli*, qui est, d'autre part, inactivée par addition de cystéine ou par un potentiel d'oxydo-réduction inférieur à 150 mv ou supérieur à 660 mv.

L'année suivante, SCHOBERT et HAMM (99) étudient l'action de la papaine sur la laine, en même temps que BACQ et DESREUX (9) signalent le blocage du système enzyme-activateur par l'isosulfocyanate d'allyle, condamnant ainsi l'usage de la diastase comme adjuvant prédigestif dans les condiments à base de moutarde.

Au cours de ces toutes dernières années, l'étude des produits d'hydrolyse des protides par différents enzymes a été entièrement révisée par l'utilisation de moyens plus modernes comme l'électrophorèse sur papier, l'ultra centrifugation, l'adsorption, la chromatographie de partage, l'analyse frontale, etc.

Ces techniques ont permis à BOULANGER (18) de présenter en 1951 un travail d'ensemble sur l'action des protéinases et sur les différents stades d'hydrolyse atteints par les principaux enzymes. C'est là une nouvelle étape dans l'étude de la protidolyse papainique: l'auteur fait état de la présence de deux ou plusieurs enzymes d'activités distinctes et signale les résultats des premières études sur des substrats synthétiques simples. Malheureusement, dans les travaux relatés, on ne signale pas de quelle papaine on est parti; en conséquence, puisque les résultats analytiques n'ont pas été obtenus avec une papaine standard ou cristallisée, le problème demeure à peu près entier. Il semble cependant que la production équivalente de groupements NH_2 et COOH par l'hydrolyse enzymatique soit définitivement acquise.

BOULANGER tire de l'ensemble de son étude des enseignements précieux sur la nature qualitative et la structure de la molécule protéique attaquée par la papaine surtout à l'état de "ZWITTER ION" avec libération de pentapeptides à partir des deux-tiers des liaisons peptidiques totales.

LINDERSTRÖM-LANG (66) au IIe Congrès International de Biochimie de 1952, à Paris, attire l'attention sur l'action des enzymes dans la dégradation des protéines en insistant sur l'importance de la dénaturation. Il ne semble pas avoir spécialement étudié la papaine et ses conclusions montrent surtout la complexité du problème.

FRUTON (43) enfin, au même Congrès, expose ses vues sur la synthèse par la papaine des liaisons peptidiques, démontrant une fois de plus, les possibilités de réversibilité des actions diastasiques, acquises depuis DUCLAUX.

Ainsi donc, nombreux sont les auteurs qui se sont penchés sur la papaine-enzyme. Malgré tout, de nombreux points restent obscurs et il nous est apparu intéressant de les élucider : origine, composition, purification, optimum de pH, optimum thermique, produits de dégradation des protides.

Cette étude fera l'objet des chapitres suivants; elle nécessite la définition préliminaire du titre de l'enzyme et des méthodes de sa détermination.

Chapitre II

LES DIFFERENTES METHODES UTILISEES POUR L'ETUDE DE L'HYDROLYSE PAPAINIQUE

Nous envisagerons successivement les méthodes physiques et les méthodes chimiques que nous discuterons en essayant de mettre au point une technique conduisant aux résultats les plus corrects, les données acquises jusqu'ici laissant subsister quelques incertitudes.

A

METHODES PHYSIQUES

I - Mesure de la Viscosité

La diminution de la viscosité de certains substrats protidiques sous l'effet de la papaine, permet de suivre rapidement la vitesse de l'hydrolyse. L'ovalbumine et la gélatine se prêtent bien à des détermination comparatives. On utilise des solutions à 1 p.100 dans l'eau bidistillée et on mesure les temps d'écoulement au viscosimètre d'Ostwald à différentes températures. Ces temps diminuent très rapidement sous l'effet de la digestion papainique, mais, au bout d'une heure environ, dans les conditions déjà signalées ci-dessus, la vitesse d'écoulement devient sensiblement constante, bien que l'hydrolyse ne soit pas complètement achevée.

II - Diminution de la formation des mousses

L'aptitude des solutions d'albumine à produire des mousses ou pouvoir "moussant" ou propriété aphrogène a été aussi utilisée pour suivre l'hydrolyse par la papaine. On sait qu'au stade anciennement classé "peptones", le

pouvoir moussant disparaît en partie. ABRIBAT (1) a décrit de nombreuses applications des mousses obtenues au laboratoire à partir des protides.

III - Thixotropie des substrats

A l'échelle industrielle, le degré d'hydrolyse d'un gel protéidique sous l'effet d'une diastase est rapidement mesuré par sa fluidification après passage à un petit turbo-broyeur de laboratoire, genre MORITZ, qui lamine et homogénéise le gel.

Le gel plus ou moins hydrolysé, présente d'autant plus rapidement le phénomène de thixotropie, que l'action de l'enzyme est moins complète. Il suffit de turbo-broyer pendant un temps fixe (30 secondes par exemples, à 3.000 tm diaphragme 0,75), puis de soumettre 5 minutes à l'agitation dans un agitateur type KAHN pour sérologie.

On peut suivre ainsi l'activité d'enzymes sur des gels de matières amylacées diverses: amidon, gommés, agar-agar, ou de substances protéidiques comme la gélatine, l'ovalbumine, en traitant 10 à 20 kg de substrat prélevés sur 5 à 10 tonnes de produit au turbo-broyeur. On place ensuite une dizaine d'éprouvettes de 100 g de gel sur un bâti d'agitateur type KAHN, ou sur une "tapoteuse". Si l'enzyme a hydrolysé le substrat, ce dernier reste liquide, il se reprend en masse dans le cas contraire .

IV - Détermination du pouvoir rotatoire des hydrolysats

La méthode est basée sur la libération de molécules à pouvoir rotatoire assez différent de celui des protéides dont on est parti au début de l'hydrolyse. Tous les échantillons de papaine libèrent des polypeptides et des amino-acides lévogyres plutôt que des dextrogyres.

L'augmentation de la rotation lévogyre (lévorotation) en fonction du temps où sa mesure finale renseigne, d'une part sur les progrès de l'action enzymatique, et permet, d'autre part, d'en chiffrer un terme. WINNICK (113), BOULANGER et BISERTE (19) utilisent cette technique pour interpréter le mécanisme de la scission enzymatique. La méthode a été retenue également par les éditions successives de la Pharmacopée Française, notamment celle de 1937 et 1949, comme complémentaire de la méthode pondérale.

Les deux rédactions du Codex diffèrent d'ailleurs fortement quant au chiffre final de l'hydrolyse obtenue pourtant très exactement dans les mêmes conditions opératoires, à savoir: même concentration en enzyme - 0,015 g -, même richesse en substrat à hydrolyser - 2,50 g de fibrine de porc étalon desséchée pour 50 ml d'eau bidistillée -, même conduite des opérations, soit deux heures au thermostat à 70° .

Examiné au polarimètre en lumière jaune, à travers un tube de 2 dm le filtrat devait donner une déviation lévogyre minimum de -2°40' en 1937, et doit donner une déviation minimum de -3°0 depuis 1949.

Ceci indique que les produits retirés du papayer doivent être plus actifs ou doivent libérer davantage de peptides et d'acides aminés lévogyres

qu'avant 1937, ou que l'observation polarimétrique doit être mieux pratiquée puisque, par ailleurs, le poids de l'extrait sec d'une partie aliquote reste identique.

La méthode polarimétrique est excellente, d'autant meilleure que le tube est plus long (5 dcm conviennent mieux), que la source monochromatique est plus puissante et que l'on élimine l'opalescence des hydrolysats. Pratiquement, on peut retenir les lectures de 2 en 2 minutes.

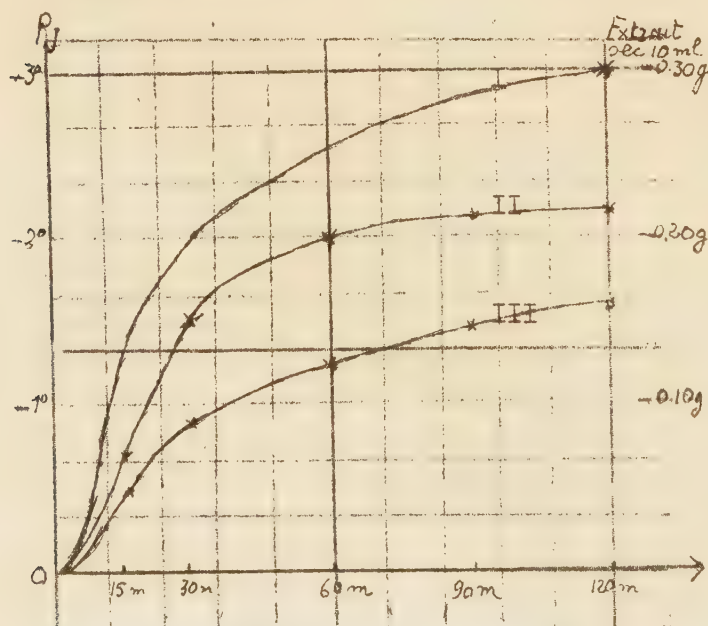
La lumière violette à $\lambda = 4.047 \text{ \AA}$ donne de plus grandes déviations que la lumière jaune à $\lambda = 5.890 \text{ \AA}$, mais n'est utilisable qu'avec les filtrats très dilués et transparents. Avec la fibrine, les filtrats sur papiers très serrés de SCHÜLL sont suffisamment clairs. Pour pouvoir lire la lévoration des hydrolysats autres que la fibrine, il faut les déféquer par l'acide trichloracétique, mais cet agent modifie le pouvoir rotatoire dans le sens d'une augmentation de la lévoration.

Voici par exemple, la rotation fournie par un échantillon de papaine de titre protidolytique 84 déterminé d'après les conditions du Codex :

	<u>Temps 0</u>	<u>P_T</u>	<u>Poids des extraits</u>
Minutes:	15	-0°,45	0,051 g
	30	-1°,32	0,083 g
	60	-2°,00	0,123 g
	90	-2°,08	0,137 g
	120	-2°,12	0,146 g

Cette méthode, contrairement aux variations données par les deux dernières éditions du Codex, est parfaitement recommandable et en harmonie avec les résultats obtenus par la pesée des extraits secs des hydrolysats. Elle est aussi rapide, plus précise, et alignée sur les autres dosages polarimétriques de la Pharmacopée.

Les deux courbes ci-dessous montrent la progression de l'hydrolyse en fonction du temps:



- I - Courbe théorique papaine minimum titrant 166
- II - Moyenne de 6 titrages par polarimétrie
- III - Moyenne des mêmes par pesée des extraits.

V - Pesée des extraits

Cette méthode convient pour les protides totalement insolubles ou très peu solubles dans l'eau, comme la fibrine, la caséine desséchée, le collagène de tendons et de peaux de ruminants, le gluten, la laine, etc.; elle ne peut pas être retenue dans les autres cas, l'extrait sec avec enzyme ne pesant guère plus que l'extrait sec sans enzyme.

C'est elle qui a été retenue par la Pharmacopée pour la détermination courante du titre des papaines commerciales.

Rappelons qu'on appelle titre protéolytique d'un enzyme, la nombre de fois son poids de fibrine sèche ou fraîche qu'un enzyme peut peptoniser dans des conditions déterminées par le Codex (la fibrine sèche correspond à quatre fois son poids de fibrine sèche essorée).

Ainsi, pour la papaine, on part de 2,5g de fibrine sèche, correspondant à 10 g de fibrine fraîche essorée, de 50 ml d'eau bidistillée et de 15 mg d'enzyme. On fait agir pendant 2 heures à 70°, en agitant toutes les dix minutes.

Selon le Codex, l'action de l'enzyme est terminée quand l'acide nitrique officinal ne donne plus de précipité avec l'hydrolysat (ce qui suppose une dégradation avancée et même pratiquement complète), et quand la pesée de l'extrait sec fourni par 10 ml atteint 0,30g, soit 1,5g pour l'ensemble, ce qui correspond à : $\frac{1,5}{2,5} = 60$ p.100 de fibrine hydrolysée.

Il y a un facteur conventionnel qu'il faut bien mentionner; la mesure de l'activité protidolytique de la papaine a été, semble-t-il, calquée sur celle de la pepsine; or, si les conditions opératoires sont presque identiques, les conclusions diffèrent. Pour la pepsine, il y a bien la non précipitation par l'acide nitrique, mais il n'y a pas de pesée d'extrait sec. Or, la fixation du taux d'extrait sec de 60 p.100 résultant, sans doute, d'une moyenne de nombreuses déterminations, porte en lui le vide d'interprétation.

Lorsque le Codex accorde à la papaine un titre de 660, il ne tient pas compte de l'extrait sec, il admet que la totalité de la fibrine mise en oeuvre a été protidolysée. Nous avons, en effet :

$$\frac{\text{Poids de substrat mis en oeuvre}}{\text{Poids de ferment}} = \frac{S}{F} = \frac{2,5}{0,015} = 166 \text{ titre}$$

exprimé par rapport à la fibrine sèche, ou $166 \times 4 = 664$ titre exprimé par rapport à la fibrine fraîche essorée, soit 660 en chiffres ronds.

Mais si nous faisons intervenir le poids de l'extrait sec, le titre enzymatique devrait être de $\frac{S}{F} = 660 \times 0,6 = 400$, alors que pour la pepsine, c'est le rapport $\frac{S}{F}$ lui-même qui est retenu pour titre, simplement quand la réaction de coagulation par l'acide nitrique cesse, le substrat ayant été transformé en "albumoses et en peptones", termes plutôt mal définis chimiquement.

Dans la troisième édition de leur Pharmacopée Galénique, GORIS, LIOT, JANOT et GORIS (47) ne s'expliquent pas très bien le titrage par détermination de l'extrait, car, disent-ils, "si la dissolution de la fibrine est complète, on devrait trouver pour 10 ml un chiffre voisin de 0,40g. Or, le Codex n'exige que la solubilisation de 1,80 g de cette fibrine mise en oeuvre et non la totalité (2,50g)".

Cette remarque renforce notre opinion, mais nous devons noter qu'une erreur s'est glissée dans le texte des auteurs qui basent leurs calculs sur l'addition de 60 ml d'eau au substrat, chiffre fixé pour le dosage de l'activité pepsique, mais non utilisé pour la papaine.

Pour avoir une hydrolyse totale justifiant le titre $\frac{S}{F} = 660$, l'extrait sec devrait peser pour 10 ml, 0,50 g et non 0,40 g, comme l'indiquent GORIS LIOT, JANOT et GORIS et encore moins 0,30g comme le spécifie le Codex.

D'autre part, la rédaction officielle est assez illogique: l'extrait sec devant être au moins égal à 0,300g, on en déduit que le titre est de 660, alors qu'il serait plus rationnel de dire au moins égal à 660 .

En résumé, lorsque l'extrait sec fourni par 10 ml pèse 0,300g, ce qui correspond à 60 p.100 de substrat hydrolysé, le titre réel est de $166 \times 0,6 \times 4 = 398,4$, soit 400 en chiffres ronds et non 660. Le titre de 660 n'est atteint que si l'extrait se rapproche de 0,500 g.

Par ailleurs, pour ne pas donner à ce titrage l'allure d'une détermination limite, il faut, d'après nous, faire varier le rapport $\frac{S}{F}$ jusqu'à ce que le poids de l'extrait sec soit constant.

MAQUENNE (72) et FLEURY (38) ont insisté sur la valeur croissante à donner au rapport $\frac{S}{F}$. Nous touchons là les problèmes quantitatifs concernant les enzymes. Le titrage de l'amylase salivaire, apparemment très simple, nécessite aussi des dosages de sucres réducteurs avec variations du rapport $\frac{S}{F}$.

La détermination du titre étant ainsi définie, nous devons signaler l'influence de quelques facteurs pouvant faire varier le poids de l'extrait sec.

1°) Le choix du filtre n'est pas sans importance. Selon que le papier est très serré ou au contraire, à filtration rapide, les résultats diffèrent notablement, ce qui n'a rien d'étonnant, puisqu'on retrouve toute une gamme de produits depuis l'édifice protidique insoluble, jusqu'aux peptides à faible poids moléculaire, et même des amino-acides.

Le meilleur filtrat est obtenu avec des doubles filtres très serrés, mais de nombreux auteurs ne mentionnent pas ce détail important.

2°) Le choix du substrat et, pour un même substrat, son homogénéité sont de première importance. Entre l'hydrolyse papainique de la fibrine de porc fraîche, de la fibrine en poudre MERCK, de celle de HOFFMANN-LAROCHE et de celle de INCM, les différences atteignent 20 p.100. L'enzyme attaque

d'autant plus aisément le substrat que celui-ci a été préparé à l'exclusion de tout agent dénaturant physique ou chimique.

3°) L'usage de tampons conduit aussi à des différences de résultats: FABRE et FROSSARD (36), recherchant l'optimum du pH pour l'hydrolyse papainique, ont utilisé la pesée des extraits secs concurremment avec la formol-titration. Ils ajoutent des tampons aux phosphates $\frac{M}{15}$ avant de porter leurs fioles au thermostat, mais ils n'indiquent pas avoir retranché du poids des extraits secs totaux, d'une part, les poids des extraits secs des tampons eux-mêmes, d'autre part, le poids des extraits secs obtenus par l'effet des tampons eux-mêmes sur les substrats sans enzyme.

Nous avons déterminé l'extrait sec réel des tampons aux phosphates $\frac{M}{15}$ ce qui donne, pour 10 ml :

pH = 5	90.8 mg
pH = 5,5	91 "
pH = 6	91.3 "
pH = 6,5	92.2 "
pH = 7	93.2 "
pH = 7,5	93.6 "
pH = 8	94.5 "

L'erreur ne dépasse donc pas 5 p.100.

4°) Pour les autres substrats, ovalbumine, gélatine, zéine, la méthode par pesée des extraits secs des hydrolysats conduit à des erreurs par suite de la nécessité de retrancher, dans des essais témoins, le poids de la partie solubilisée par l'eau ou les solutions tampons, qui est évidemment plus considérable que pour les protides insolubles.

Inconvénient de la méthode officielle.-

Proposition de détermination de l'activité protidolytique de la papainase par polarimétrie.

La méthode officinale par pesée des extraits, suivie d'une mesure d'un pouvoir rotatoire minimum, présente un certain nombre d'inconvénients:

1°) Etant un titrage à poids constant d'enzyme et de substrat, le rapport $\frac{S}{F}$ ne varie pas et l'activité mesurée est une activité limite.

2°) Elle ne tient pas compte du caractère incomplet de la fibrinolyse et applique un coefficient empirique de 60 p.100.

3°) Elle ne précise pas la qualité du filtre utilisé.

4°) Elle laisse la prédominance à la pesée de l'extrait sec du filtrat, la détermination du pouvoir rotatoire, bien que témoin indiscutable de l'activité protidolytique qualitative autant que quantitative, est secondaire et non utilisée dans le calcul du titre.

Nous proposons donc la technique suivante basée sur la mesure du pouvoir rotatoire de l'hydrolysat de fibrine par la papaine, qui élimine les inconvénients mentionnés.

TECHNIQUE PROPOSEE (75)

"Quatre Erlenmeyers de 100 ml bouchant à l'émeri sont nettoyés au mélange sulfochromique à l'ébullition, puis rincés à l'eau ordinaire, à l'eau distillée, à l'eau bidistillée et enfin séchés.

" Dans trois d'entre eux, on pèse 2,5 g, 5 g, 7,5 g de fibrine de porc desséchée en poudre étalon INCM et ajoute à chacun 15 mg d'enzyme à titrer, pesé à 0,1 mg près; le quatrième reçoit 5 g de fibrine seulement. On verse dans les quatre récipients 50 ml d'eau bidistillée portée au préalable à 70° et mesurée au ballon taré à 50 ml à l'eau bidistillée portée à 70°.

" Les quatre Erlenmeyers sont plongés dans un thermostat à eau à agitateur mécanique à la température de 70° et le temps initial est noté. On retire les récipients au bout de deux heures exactement, on les immerge dans de l'eau glacée, puis filtre sans dépression sur double filtre SCHLEICHER-SCHULL n°602 ou LAURENT très lent, en repassant les filtrats jusqu'à ce qu'ils soient transparents.

" On procède alors à la lecture polarimétrique en lumière jaune à 20°; la plus forte lévoration est retenue. On la diminue éventuellement des quelques minutes d'arc données par la fibrine non traitée par la papaine.

" On donnera le titre de 400 pour une lévoration du filtrat (après correction du témoin) égale à 180 minutes d'arc.

" 1 minute d'arc équivaut donc à un titre de 2,222.

" Soit ρ la déviation observée, $\rho \times 2,222$ donne le titre de la papaine essayée.

" Il sera bon de s'assurer, par un essai séparé sur l'amidon, de l'absence d'activité amylolytique pouvant perturber la détermination polarimétrique".

Cette proposition tient compte :

- 1°) De la nécessité de faire varier le rapport $\frac{S}{F}$;
- 2°) Des concentrations déjà admises d'enzyme et de substrat;
- 3°) Du titre de 660 multiplié par le facteur 0,6 donné par la pesée des extraits secs, alors que la réaction nitrique a disparu, ce qui ramène le titre à 400;
- 4°) De la simplicité des mesures polarimétriques.

Comparaison entre la méthode officielle et la méthode polarimétrique proposée

Le tableau suivant donne des résultats de mesures sur 6 échantillons de diverses papaines. Le calcul du titre est pratiqué selon la méthode du Codex et selon la méthode polarimétrique:

Papaines	Déviations polarimétriques	Poids des extraits	Titre Codex 1949	Titre par mé- thode proposée
Echantillon n°1	-2°12	0,146	321	293
" n°2	-2°30	0,152	334	333
" n°3	-2°22	0,142	312	315
" n°4	-2°05	0,138	303	277
" n°5	-3°05	0,166	365	410
" n°6	-2°47	0,154	339	370

Dans notre premier exemple, la papaine ayant donné 2°12, soit 132 minutes, titre 293 par polarimétrie; or, elle titre d'après la pesée de l'extrait sec - 0,146 - 321 selon le Codex de 1949 ($\frac{S}{F} = 660 \times \frac{146}{300}$) et 192 seulement si on applique le raisonnement adopté pour la pepsine : ($\frac{S}{F} = 660 \times \frac{146}{500}$).

Ainsi, d'après nous, vaut-il mieux retenir la mesure polarimétrique qui ne laisse pas une telle marge.

B

METHODES CHIMIQUES

Elles sont basées sur le dosage des produits d'hydrolyse.

I - Méthode par détermination de l'azote total non protéique

Les défécations par l'acide trichloracétique à 20 p.100 ou par le phosphotungstate de soude à 10 p.100 et l'acide sulfurique à 0,5N à parties égales, permettent, par centrifugation et à froid, l'élimination de l'azote total protéique. Dans le filtrat, la kjeldahlisation renseigne instantanément sur le degré de l'hydrolyse papainique.

Cette technique simple aurait pu être retenue comme méthode officielle. Pour la recherche elle est compatible avec l'emploi de tampons aux phosphates alcalins; elle l'est moins avec les tampons organiques en raison de la longueur de la minéralisation.

BALLS et LINEWEAVER (11) kjeldahlisent, au contraire, le précipité de protides obtenu avec l'acide trichloracétique à 2,5 p.100 dont ils ajoutent 10 ml à 1 ml au moins de solution de protéine, chauffent à 75° pendant 10 à 15 minutes, puis centrifugent. Le liquide surnageant est décanté et le précipité est lavé avec l'acide à 2,5 p.100 puis recentrifugé.

La protéine précipitée est alors dissoute dans 1 ml d'acide sulfurique de densité $d = 1,66$, puis on titré et kjeldahlise.

Rappelons que la différence des azotes totaux trichloracétique moins phosphotungstique est un indice empirique mais non négligeable des polypeptides.

II - Méthode utilisant la réaction du biuret

Les hydrolysats papainiques donnent fortement la réaction du biuret. En opérant avec le réactif :

SO ₄ Cu	0,3 g
H O Na ajoutée à froid	10 g
Eau	q.s.p. 100 ml

Employé à 11 gttes par ml d'hydrolysate, on obtient instantanément et à froid, la coloration rose violette caractéristique permettant de pratiquer un dosage colorimétrique.

Cette méthode est très commode pour les comparaisons en série, ne demande que de faibles prélèvements qui n'obligent pas à recourir comme pour la polarimétrie, à des éprouvettes trop volumineuses entraînant l'usage de grands thermostats.

Sans fournir un chiffre exact comme la kjeldahlisation, ou la formol-titration de SØRENSEN, la méthode au biuret renseigne très rapidement sur l'optimum d'une hydrolyse; elle a aussi l'avantage de ne pas être influencée par la présence de tempons minéraux à condition que l'alcali soit suffisant.

N.B.: La méthode de la ninhydrine fournit aussi des résultats intéressants quant aux produits de l'hydrolyse. On utilise une solution de ninhydrine à 1 p.100 qu'on fait agir une minute à 100°.

La fibrine et l'ovalbumine donne nt au bain-marie une intense coloration bleu violacé caractéristique. Au contraire, la gélatine ne donne pas la réaction au bout du temps prescrit; la coloration apparaît en 10 minutes.

III - Méthode à l'hippuramide

2 ml de solution d'enzyme sont ajoutés à 1 ml d'eau ou de solution des activateurs déjà cités de la papaine, puis additionnés à 87 mg d'hippuramide dissoute dans 14 ml de tampon acétate 0,1 M à pH = 4,9. On place au thermostat à 30°. Des échantillons de 0,7 ml sont prélevés et titrés par H O Na 0,02N par la formol-titration selon NORTHROP (78).

BALLIS définit par sa technique l'unité d'activité papainique qu'il appelle "(Papain-Unit H.A.) ou (Pa. u) HA".

C'est la quantité d'enzyme qui cause une augmentation de la titration représentant l'hydrolyse de l'hippuramide à la vitesse initiale de 1 milli-équivalent par minute.

Nous avons surtout procédé à l'étude critique des deux méthodes suivantes, la formol-titration et la méthode acidimétrique directe.

IV - Méthode au formol

La vieille technique de formol-titration de SÖRENSEN-ROSCHE a été très largement employée dans de nombreux travaux concernant la papaine, notamment ceux de CHOAY, de FROSCARD, de TAYEAU et BUFFE, etc. Elle est encore indiquée pour les substrats autres que la gélatine et la fibrine.

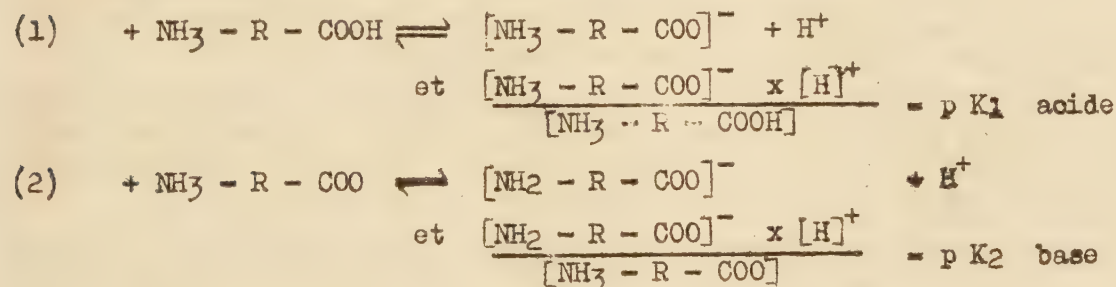
Même en s'aidant de témoins préparés dans des conditions identiques, avec la phénolphthaléine comme indicateur, on arrive difficilement à des résultats concordant dans les hydrolysats papainiques.

Tout d'abord, remarquons, avec GORIS, LIOT, JANOT et GORIS (47), que la formol-titration doit être déconseillée car elle n'indique que le degré de formation des amino-acides et non celle des produits de dégradation intermédiaire.

Modifiée par l'emploi de deux indicateurs, le rouge neutre et la phthaléine, cette technique a permis à SÖRENSEN de déterminer les teneurs respectives en amino-acides et en polypeptides. D'après NORTHROP, la méthode serait encore à conseiller avec des solutions centinormales.

Pour CHARLOT et BEZIERS (25), la formol-filtration donne des résultats convenables si l'on connaît l'acide-amino et ses constantes de dissociation.

Les réactions d'un mono-amino-acide s'écrivent :



pK_1 va de 1.8 à 3.1, tandis que pK_2 va de 8.1 à 9.8.

Pour les mono-amino-diacides, on a pK_1 toujours voisin de 2, pK'_1 autour de 4 et pK_2 autour de 9.

L'addition de formol diminue le pK_2 de 3 unités en moyenne ce qui permet le titrage acidimétrique.

Inconvénients:

MATHIEU décrit en détail les techniques de SÖRENSEN et de NORTHROP (73), et mentionne auparavant "qu'il ne s'agit pas de méthode quantitative au point de vue absolu" et que la liqueur à doser ne doit contenir ni carbonates, ni phosphates, ni ammoniac, ni matières protéiques.

On comprend que, dans ces conditions, le virage des colorants dans la technique de SÖRENSEN soit peu net dans les hydrolysats papainiques. Ceci est dû à la grande variabilité des pK , comme nous l'avons vu ci-dessus.

Par ailleurs, comme la détermination de l'optimum des pH par exemple, se fait en milieu tampons phosphate, une cause d'erreur est ainsi introduite; il est difficile de la chiffrer même en présence de témoins.

Nous avons pu vérifier nous-même la valeur des critiques de MATHIEU.

Voici par exemple des titrages de différents amino-acides des collections de MERCK et HOFFMANN - LAROCHE, par formol-titration dans des solutions tamponnées aux phosphates mono-potassique, disodique de $pH = 5$ à $pH = 7$:

Amino-Acide		Formol-Titration - Différence en ml HON à 0,1N				
		$pH = 5$	$pH = 5,5$	$pH = 6$	$pH = 6,5$	$pH = 7$
1- Glycocolle	$pH_i = 6,0$	9,39	9,46	9,62	9,77	9,94
2- Alanine	$pH_i = 6,05$	6,12	6,20	6,36	6,38	6,43
3- Acide glutamique	$pH_i = 3,08$	6,59	6,64	6,88	7,04	7,2
4- Acide aspartique	$pH_i = 2,97$	3,2	3,3	3,4	3,7	4,0
5- Arginine	$pH_i = 10,7$	7,80	7,87	7,93	8,11	8,20

Toutes les solutions d'acides-amino sont 0,1 M, les prises d'essais sont toutes de 10 ml. Les différences de résultats tiennent à la variabilité du point isoélectrique, selon que l'on titre un mono-amino-mono-acide (1 et 2), un mono-amino-diacide (3 et 4), un diamino-mono-acide (5), etc.

Pour être quantitative, la formol-titration devrait donner 10 ml de HONa 0,1N. On voit qu'elle s'en écarte notablement.

La difficulté d'apprécier les virages des colorants phthaléiniques dans les hydrolysats papainiques nous a conduit à préférer l'électrotitrimétrie au potentiomètre de QUERE, beaucoup plus facile à utiliser que la plupart des autres appareils grâce à ses corrections de température.

Les solutions d'acides-amino sont ajustées avant l'addition de formol à $pH = 8,6$ à 20° et non à 7,0 pour obtenir des résultats peu différents de ceux de la formol-titration aux indicateurs. Le formol est amené au même pH . Après action du formol ajouté en même excès mesuré (20 ml de formol au demi pour 10 ml de solution d'acide-amino), on ramène à $pH = 8,6$ par affusion régulière de HONa 0,1N versé à la burette automatique dans la liqueur soumise à l'agitation électromagnétique.

Comme le terme admis par l'emploi des indicateurs pour le titrage des acides-amino est $pH = 8,6$ en moyenne, les résultats potentiométriques sont voisins, dans ces conditions, de ceux obtenus par colorimétrie. Toutefois, comme nos mesures sont souvent comparatives, les chiffres conservent leurs valeurs relatives.

Il est difficile, par ailleurs, d'affirmer l'exactitude des pH électrométrique dans les appareils utilisant l'électrode de verre au-dessus

de pH = 9,0. La réponse du potentiomètre linéaire de 1 à 9 donne une inflexion à partir de ce point WULFF (115), CHARLOT et BEZIER (25) apportent une correction croissante à partir de pH = 10.

Mentionnons aussi la nécessité d'éviter le moindre échauffement au potentiomètre. La plus faible chaleur de neutralisation nécessite la correction bien connue, la neutralité étant de 7,15 à 15°, de 7,0 à 22°, de 6,90 à 28° et de 6,75 à 37°, du moins pour l'eau bi-distillée. Or, une neutralisation s'accompagne souvent, même pour les composés organiques, d'un effet thermique non nul.

V - Mesure d'acidimétrie directe

WILLSTAETTER (112) mesure l'activité de la papaïne en présence de cyanures par simple acidimétrie. Voici comment il opère :

Réactifs :

- 1°) Solution de papaïne à 1,5 p.100 et filtrée.
- 2°) Solution à 3 p.100 d'acide cyanhydrique obtenu par neutralisation de 10 ml d'une solution à 6 p.100 de cyanure de potassium en présence de rouge de méthyle par Cl H N. Il en faut environ 8 ml. On complète à 20 ml. Cette solution ne se conserve pas.
- 3°) Solution 0,2 M de citrate disodique selon SØRENSEN.
- 4°) Solution à 6,66 p.100 de la meilleure gélatine du commerce.

Technique :

Dans un microerlenmeyer de 10 ml, on introduit un mélange de 1 ml de solution de citrate et 0,4 ml d'acide cyanhydrique, puis 2 à 2,5 ml de solution d'enzyme à étudier. On porte 2 heures au thermostat à 40° puis ajoute 6 ml de la solution de gélatine (0,4 g de gélatine).

On bouche l'Erlenmeyer et l'agite.

On prélève, de 10 en 10 minutes, 1 ml du milieu en cours d'hydrolyse et titre avec la potasse alcoolique 0,1 M en présence de thymolphthaléine.

Remarques :

En dehors du prélèvement à la pipette des 6 ml de la "solution" de gélatine qui, à 40°, est encore ferme, raison qui a sans doute justifié l'indication du poids dans la rédaction de l'auteur, la technique de WILLSTAETTER est facile.

Toutefois, la composition des gélatines commerciales est des plus variable, et les résultats par acidimétrie ne sont comparables ni à la polarimétrie ni à la pesée des extraits, ni à la formol-titration, ni à la kjeldahlisation.

Les résultats se déplacent seulement dans le même sens.

Cette méthode, comme l'indique FLORENCE (39) est à recommander

toutefois pour comparer l'activité d'un échantillon à un standard connu. En se rapportant à une courbe étalon, on peut déduire le nombre d'unités contenues dans la solution initiale de l'enzyme.

La technique de WILLSTAETTER reste la même si l'on remplace l'acide cyanhydrique par un autre activateur. On utilise une solution fraîche de glutathion à 100 mg pour 5 ml ou une solution de chlorhydrate de cystine à 5 mg par demi-ml. Il serait inutile, avec ces activateurs, de laisser incuber l'enzyme avec l'activateur pendant deux heures, mais indispensable, par contre, de faire précéder chaque ouverture des Erlen d'un barbotage d'azote privé d'oxygène par le pyrogallate de potassium.

C

METHODES DIVERSES

1 - Méthode de digestion de l'hémoglobine (ANSON) (2)

La méthode d'ANSON utilise de l'hémoglobine comme substrat qu'on laisse digérer pendant une demi-heure à 30°. Au bout de ce temps, on centrifuge et précipite par l'acide trichloracétique et dose la substance colorée non précipitable par le déféquant. On opère dans le liquide non précipitable en comparant à une solution de tyrosine traitée dans les mêmes conditions par le réactif des phénols de FOLIN et CIOCALTEAU. Pratiquement, on part de 0,2 mg de papaine commerciale, ou de 0,01 mg de protide de latex. L'unité de papaine selon ANSON ou (Pap.unité) H I est celle qui produit, par minute, dans 6 ml de liquide en digestion, une teneur en substance non précipitable par l'acide trichloracétique donnant une coloration identique à un milliéquivalent de tyrosine au réactif des phénols.

II - Mesure de la coagulation du lait ou "pressure-test"

Ce test est recommandé par BALLS et HOOVER (10). Il est calqué sur le même utilisé pour la pepsine et la trypsine (chymotrypsinogène, chymotrypsine, trypsine).

BALLS définit une unité de papaine "Milk", c'est la quantité de papaine qui coagule 5 ml de préparation de lait standard à 30° en une minute.

Connaissant la difficulté des titrages d'enzymes, on comprend qu'un enzymologue comme BALLS ait recherché une méthode comme le "pressure-test" semblant résoudre d'emblée un problème comportant autant de variables.

III - Procédé GRUTZNER (49)

On utilise de la fibrine de porc étalon desséchée, délipidée deux

fois par son poids d'alcool à 95°, mais simplement broyée et non tamisée au tamis n°26. On colore cette fibrine au microcarminate d'ammonium.

Cette fibrine est soumise à l'hydrolyse papainique. A mesure que la fibrine se dissout, elle abandonne sa matière colorante.

On peut alors apprécier au colorimètre la quantité dissoute d'après la coloration du liquide par le microcarminate et on compare le résultat obtenu avec une papaine type.

IV - Méthode de METT (77)

La vieille technique classique de METT permet, notamment de retrouver la papaine et son activité protidolytique dans les substrats complexes comme les élixirs, les sirops et, surtout, les pommades où la plupart des autres méthodes échouent quand on n'est pas sûr de leur non-interférence avec les substrats eux-mêmes.

On peut laisser la digestion du blanc d'oeuf s'opérer à 80° pendant 6 heures au moins pour avoir quelques millimètres de protides coagulés liquéfiés. En comparant les longueurs digérées, en opérant sur une dizaine de tubes, avec les résultats fournis par une solution d'enzyme pure traitée dans les mêmes conditions, on peut ainsi affirmer, si l'on retrouve 20, 30, 40 p.100 etc., de l'activité enzymatique initiale.

V - Test de RAMON (90)

RAMON dose l'activité de la papaine sur un substrat facile à se procurer, la gélatine. L'unité RAMON de papaine est la quantité de papaine nécessaire pour liquéfier en 4 heures, au thermostat à 45°, 2 ml d'une solution de gélatine à 4 p.100. Cette unité est commode pour les microbiologistes.

VI - Test de SPEYER (100)

Très récemment, SPEYER conseille - pour la trypsine, il est vrai - une hydrolyse de la caséine à 1 p.100 dans une solution d'agar-agar à 2 p.100 coulée en boîte de Pétri. C'est au fond une variante de notre technique à la gélatine colorée au polyindicateur.

D

METHODE PERSONNELLE

Nous avons mis au point une méthode qualitative simple qui est voisine de celle de WILLSTAETTER. Au centre d'une plaque de gélatine à 5 p.100 neutralisée et colorée en vert au polyindicateur de GUILLAUMIN, puis coulée et solidifiée en boîte de Pétri, on dépose une grosse goutte de la solution d'enzyme à 10 p.100. En 48 heures à la température du laboratoire, en quelques heures à 37°, il apparaît une cupule liquéfiée, avec jaunissement de la gélatine décroissant à partir du centre de la goutte.

Cette technique simple permet de dire si on se trouve ou non en présence d'une préparation active; elle permet l'exploration rapide de parties de plantes et peut, croyons-nous, rendre service à la prespection botanique ou zoologique des enzymes gélatinolytiques.

RESUME ET CONCLUSION DU CHAPITRE II

1°) Dans ce chapitre, nous avons passé en revue les principales méthodes d'étude de l'hydrolyse papainique, dont nous exposons le principe et la technique.

2°) Il est fait une critique de la méthode officielle de la pharmacopée française pour la détermination de l'activité protidolytique de l'enzyme.

3°) Une proposition de modification de cette méthode est présentée: on fait varier le rapport $\frac{\text{substrat}}{\text{enzyme}}$ et on adopte de préférence la mesure polarimétrique à celle de la pesée des extraits secs.

4°) La méthode chimique de SÖRENSEN et la méthode de WILLSTAETTER ont été discutées.

5°) Nous proposons une nouvelle technique applicable à un essai qualitatif rapide.

Chapitre III

ORIGINE, COMPOSITION et PURIFICATION DES PAPAINES UTILISEES

I

ORIGINE

Le Codex définit la papaine ou suc de papayer, ainsi que nous l'avons déjà dit, comme le latex obtenu par incision un peu avant la maturité, des fruits de *CARICA PAPAYA L. PAPAYACEES*". Il ajoute que par dissolution de ce suc dans l'eau et par précipitation alcoolique, on obtient une "papaine purifiée possédant une forte activité protéolytique".

On peut donc, officiellement, appeler papaine, le latex épaissi aussi bien que le précipité alcoolique d'enzyme obtenu à partir de sa solution aqueuse.

Les échantillons que nous avons étudiés correspondent à ces deux éventualités.

Nous désignons leur titre par rapport à la fibrine sèche pour nous conformer aux usages commerciaux.

1°) Une papaine vermiculée titrant 60⁽¹⁾ provenant du Tanganyika, pays réputé pour produire les latex à hauts titres.

2°) De nombreuses poudres d'enzymes précipitées par l'éthanol:

a) une papaine de référence, titrant 100, fournie par l'Institut Pasteur de Paris,

b) Une papaine commerciale courante, titrant 71, extraite vraisemblablement de papayers de Ceylan,

(1) Les deux premiers échantillons ont été très aimablement mis à notre disposition par M. le Docteur LE MINOR de l'Institut Pasteur de Paris que nous sommes heureux de remercier ici.

c) une papaine titrant 84, des Laboratoire UCIAT, se présentant sous forme d'une poudre amorphe, assez légère, blanche, légèrement orême, donnant un aérosol très fortement hygroscopique, et d'origine antillaise probable,

d) deux échantillons de papaine américaine, titrant 70, de DELTA CHEMICAL WORKS, New-York, parfaitement amorphe, sans origine géographique précise.

Tous ces échantillons répondaient aux normes du Codex français; humidité et cendres inférieures à 12 p.100, absence d'amidon.

C'est principalement sur la papaine 84 qu'ont porté nos travaux.

Il s'agit d'un lot industriel correspondant probablement aux meilleures conditions de collecte, arbres jeunes et entretenus, fruits non encore mûrs, récolte du latex sans excès d'humidité, précipitation alcoolique convenable, enfin, séchage rapide et stockage en boîtes soudées.

Signalons que d'après LANGLEYKE, SMYTHE et PERIMAN (62), la majeure partie de l'activité enzymatique initiale est perdue au cours de la dessiccation et de la mouture du latex.

II

COMPOSITION

A - Analyse immédiate

Nous avons analysé la papaine 84 qui nous a donné les résultats suivants :

1°) Humidité à 100-102°	2,25 p.100
2°) Glucides totaux (réductimétrie au Fehling exprimée en glucose anhydre)	5,6 "
3°) Lipides totaux :	
a) Extractibles au Kumagava par l'éther rectifié anhydre privé de peroxydes sur chlorure stanneux	8,98 "
b) Extractibles à l'alcool éther ââ	8,16 "
c) Extractibles à l'acétone anhydre	7,4 "
d) Extrait éthéré repris par le chloroforme	7,1 "
4°) Protides totaux (N total au Kjeldahl x 6,25)	71,2 "
5°) Cendres	11,79 "
Solubilité dans l'eau bidistillée à 40°C : donne un extrait sec aqueux rapporté à la poudre initiale de	87 "
6°) pH de la poudre	5,2

Examen microscopique en lumière naturelle et polarisée :

La poudre présente des globules amorphes de grosseurs variables de 4 à 100 µ avec quelques débris de tissus végétaux.

On note l'absence d'amidon et de substances actives sur la lumière polarisée.

Composition des cendres. Effecteurs métalliques de l'enzyme :

L'analyse des cendres, rapportée au poids de papaine sèche, a donné les résultats suivants pour les éléments recherchés:

P	=	0,52	p.100
Ca	=	2,01	"
Mg	=	0,15	"
S	=	1,7	"

Chaque élément mérite quelques remarques :

Phosphore : Cet élément, dosé par la microméthode volumétrique de MACHEBOEUF, représente le phosphore total, minéral et organique. D'après ce qui suit concernant l'existence du ribose, le phosphore peut figurer comme constituant d'un ribonucléotide. Cependant, le chiffre est trop élevé et il est certain que plus des trois quarts du phosphore existent à l'état de phosphates alcalins et terreux.

Calcium et magnésium : Il est intéressant de signaler ici la teneur élevée en métaux terreux divalents, concentrés dans le précipité alcoolique du latex. Constituants normaux des sèves, la teneur élevée en ces éléments est certainement à rapprocher des conceptions de ROCHE (94) concernant les effecteurs métalliques "valentiels" des coenzymes; l'électrophorèse des enzymes a renforcé cette opinion. La forte activité protidolytique du dialysat en est une autre preuve bien que BAILS ait signalé dans la composition de son enzyme cristallisé l'absence de tout effecteur métallique et l'absence de phosphore.

L'élimination des cations divalents dans le dialysat n'a pu être effectuée sans altérer la nature azotée de l'enzyme, les précipitations ordinaires de ces métaux par leurs réactifs conduisant à une perte d'activité enzymatique trop importante. BAILS et LINEWEAVER ont dû précipiter le phosphore au second temps de leur cristallisation, du fait de leur ajustage à pH = 9 et de la présence d'un excès de cations Ca^{++} et Mg^{++} .

Soufre : La teneur en soufre total dans les cendres est certainement très inférieure à la teneur réelle en soufre du produit frais, une partie s'éliminant à l'état de SH_2 au cours de la calcination et la partie minéralisée à l'état de sulfates pouvant provenir aussi bien de sulfates minéraux préexistants que du soufre constituant des molécules organiques.

Chlore, Sodium, Potassium, Silicium : La teneur de ces éléments dans les cendres de la papaine ne comporte rien de bien particulier qui ne soit connu. La richesse relative en potassium est assez classique chez les végétaux qui croissent loin des mers.

B - Caractères des Différentes Fractions de l'Enzyme

1°) Fraction glucidique :

La présence d'hexoses est certaine, mais il s'agit vraisemblablement de mannose provenant de l'hydrolyse des mannanes naturels. La recherche et le dosage éventuel des pentoses a retenu plus particulièrement notre attention. Si la réaction à la diphénylamine en milieu sulfurique et acétique, considérée avec DISCHE comme une assez bonne réaction des désoxypentoses, a été négative; au contraire, celle à l'orcinol chlorhydrique en présence d'ions ferriques dite de BIAL-WEJBAUM, caractéristique des pentoses a été très nettement positive.

En utilisant un appareillage entièrement de verre, nous avons, avec BIANQUET et DELMON (4) dosé colorimétriquement les pentoses par la réaction à l'orcinol. Nous avons ainsi trouvé 60 mg p.100 g de poudre d'enzyme; le titrage par l'acétate d'aniline a confirmé ce chiffre qui peut être interprété comme représentant la somme des pentoses libres, en provenant de l'hydrolyse des arabanes, et des pentoses pouvant exister sous forme d'acides pentosenucléiques. On sait, en effet, que la réaction de BIAL à l'orcinol permet de retrouver environ 50 p.100 du ribose constituant les molécules d'acides pentosenucléiques, ribomolécules principalement.

La réaction au naphtorésorcinol de TOLLENS est également positive, preuve de l'existence d'uronosides dans l'enzyme.

La détection de la glucosamine n'a pas été nette par voie chimique, elle est meilleure par chromatographie.

2°) Fraction lipidique :

Cette fraction avait initialement paru intéressante car nous avions cru lui attribuer un rôle biochimique important. En réalité, nous avons dénaturé les protéides par des réactifs insuffisamment exempts de peroxydes et nous avons pensé que les lipides étaient indispensables pour conserver l'activité de l'enzyme. Or, l'enzyme délipidé à 0° par des solvants anoxygénés conserve toutes ses propriétés.

La fraction se comportant comme lipides contient des phytostérols, des polyisoprènes et des lécithines. Les deux premiers ont été retrouvés dans l'insaponifiable par la réaction de LIEBERMANN (coloration verte pour les phytostérols, rouge-violette pour les polyisoprènes), les troisièmes dans la fraction lipidique acétono-insoluble.

3°) Fraction protidique :

Il était naturel que cette fraction retint plus longtemps notre attention.

a) Caractérisation chimique de certains constituants protidiques:

Théoriquement, dans la conception classique, un enzyme contient un ou des holoprotéides dans sa partie apoenzymatique, et des substances

qu'il est peut-être inexact d'appeler un ou des groupements prosthétiques, le ou les coenzymes, en tous cas qui ne sont pas des protéides. Dans le coenzyme, la présence d'acides aminés doit être pratiquement nulle. En réalité, il est aisé de mettre en évidence un certain nombre de constituants de bas poids moléculaires qui dialysent facilement.

Nous nous bornerons à citer ceux, d'après nous, qui méritent d'être signalés:

A c i d e g l u t a m i q u e : Nous avons spécialement recherché la présence de cet acide dans l'enzyme en raison de l'importance de son rôle biologique comme facteur de croissance de nombreuses cultures microbiennes. Le résultat nous importait pour la deuxième partie de notre travail.

Aucune des méthodes chimiques classiques ne nous ayant donné satisfaction, notamment la technique de DAKIN après hydrolyse chlorhydrique puis épuisement au butanol, celle d'ABDERHALDEN, FUCHS, FOREMAN par précipitation du glutamate de cuivre, celle de VAN SLYKE et FOLCH (106), nous avons retenu l'action de la glutamodécarboxylase conseillée par POLONOVSKI (84) à l'appareil de WARBURG, en utilisant comme décarboxylase du suc aqueux frais de levure. La recherche a été négative et nous ne pensons pas qu'il y ait de l'acide glutamique libre dans la papaine à moins que l'enzyme papaine agisse comme antienzyme des décarboxylases.

G l u t a t h i o n : Le tripeptide précipite de la solution aqueuse de papaine 84 à 10 p.100 par action de l'acide trichloracétique après longue centrifugation quand on ajoute du lactate de cadmium. Comme notre enzyme s'est révélé de bonne qualité et peu altéré, il est vraisemblable qu'il s'agit de l'activateur naturel de l'enzyme. Le titrage iodométrique selon BINET et WELLER (17), donne une centaine de mg de glutathion réduit par 100 g de poudre fraîche, chiffre qui doit être retenu comme un ordre de grandeur en raison de la difficulté, de l'imprécision et de la spécificité toute relative de ce dosage.

C y s t é i n e e t c y s t i n e : D'abord dosés par la réduction au sulfate de cuivre et nitroprussate de soude, les deux acides aminés soufrés red-ox ont été ultérieurement titrés à nouveau par la technique de SULLIVAN, HESS et HOWARD (101) au naphtoquinone 1-2 sulfonate de sodium, en présence d'hydro-sulfite de sodium alcalin.

Ce titrage délicat donne plus de 500 mg p.100 de poudre de composés dosés colorimétriquement par le naphtoquinone sulfonate.

Il n'est pas certain que ce chiffre corresponde à la réalité en raison de la présence vraisemblable d'autres molécules thio-aminées et de sulfures minéraux qu'il est impossible de différencier du soufre total minéral et organique.

T r y p t o p h a n e : Dans les mélanges d'acides-amino, le dosage du tryptophane n'est pas toujours aisé. Nous sommes parti d'une solution étalon de tryptophane HOFFMANN-LAROCHE à 0,500g par litre que nous avons dilué à 0,250, 0,125, 0,050g par litre. A ces teneurs, la réaction de Gmelin ne donne rien. La réaction glyoxylique d'Adamkiewicz, modifiée par Hopkins et Cole, donne la teinte zinzolin classique pour la solution étalon; il n'y a pratiquement plus rien pour les chiffres inférieurs.

La réaction de Hess-Sullivan de diazotation par l'acide chlorhydrique nitreux et copulation avec le paradiméthylaminobenzaldéhyde sulfurique puis chlorhydrique n'est pas autre chose que la réaction de Kovacs employée en microbiologie pour caractériser le noyau de l'indole.

Elle donne d'assez bons résultats.

La réaction phosphovanillique de Blanchetiere donne, après addition de vanilline cristallisée en milieu phosphorique à température légèrement inférieure à l'ébullition, les colorations suivantes :

0,500 mg par litre :	coloration violette
0,250 mg	" " violet et jaune
0,125 mg	" " jaune
0,050 mg	" pas de coloration.

A l'aide des réactions de Kovacs et de Blanchetiere, nous avons pu titrer le tryptophane et nous avons trouvé 300 mg de cet acide-amino pour 100 grammes de papaine.

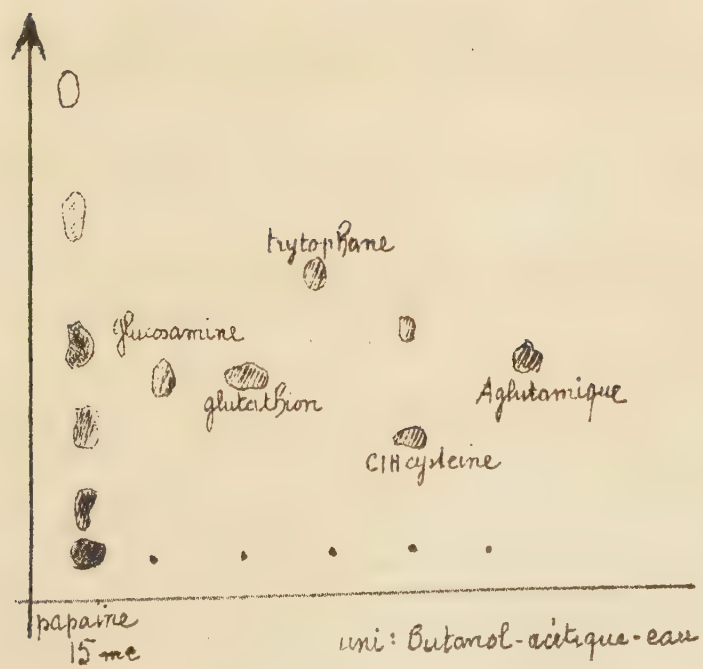
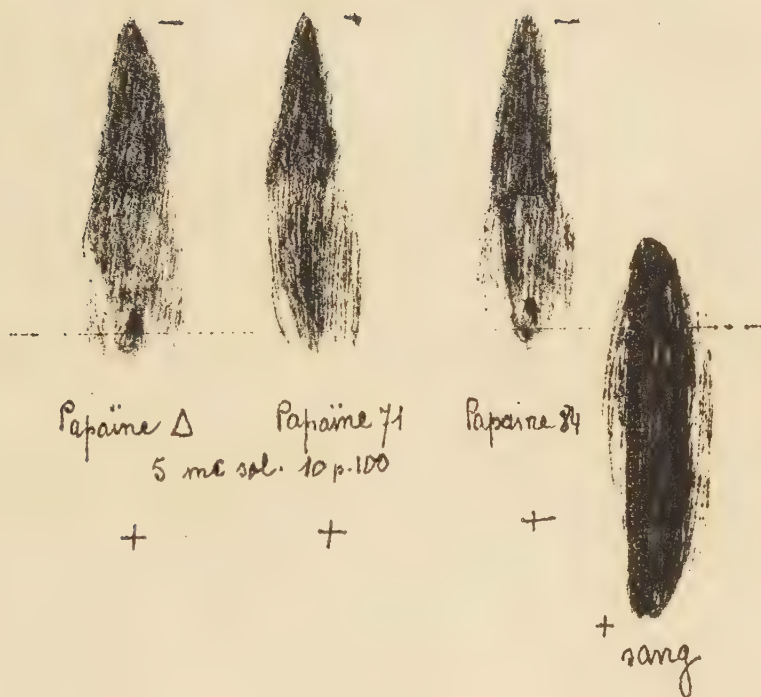
b) Caractérisation chromatographique et électrophorétique des constituants protidiques papainiques:

La chromatographie ascendante unidimensionnelle en phase butanol acétique et bidimensionnelle à seconde phase phénol ammoniacal, a été essayée selon la technique de Macheboeuf, Cachin et Blass (69) sur des solutions aqueuses de papaine à 10 p.100 sur papier Arches 301 non lavé à l'acide.

Les spots révélés à la ninhydrine à 0,5 p.100 dans le butanol, ont montré, à côté d'une grosse fraction protidique, n'ayant subi pratiquement aucune migration, la présence de glucosamine, de glutathion, de tryptophane et de cystéine. Les chichés ci-contre confirment ainsi ce que l'analyse chimique nous avait révélé.

Pour l'acide glutamique qui donne un spot net, mis à profit par Mesnard et Mademoiselle Liermain (76) pour sa recherche dans les médicaments, il est difficile de dire s'il s'agit de l'acide libre ou de la partie constituant la glutathion. D'après les résultats obtenus par voie chimique, on pencherait plutôt en faveur d'acide glutamique combiné qui est plus ou moins hydrolysé par le butanol acétique.

L'électrophorèse sur papier à l'appareil de Macheboeuf et Rebey-Rotte nous a donné des images microélectrophorétiques assez caractéristiques pour chacun des échantillons essayés. Sous une différence de potentiel constante et continue de 350 volts pour 7 milliampères, des gouttes de 5



millicubes de solution à 10 p.100 d'enzymes ont été "étirées" par le courant pendant quatre heures, avec les autres conditions classiques, 20°C pour limiter l'échauffement ohmique, en tampon Véronal à pH = 8,6.

Les différentes pistes ont été révélées au bleu de bromo-phénol après action du sublimé acétique, ou au réactif de FOLIN et CIOCALTEAU, ou au butanol-ninhydrine. Le cliché au bleu de bromo-phénol a été tiré en même temps que celui de substrats avant et après hydrolyse enzymatique, ainsi qu'avec quelques pistes repères de sangs normaux pour situer approximativement les spots d'enzymes par rapport aux constituants albumine et globulines du sang.

On est frappé par la présence d'une fraction électro-statiquement positive attirée vers le pôle ---, alors que la majeure partie des constituants protéiques sanguins chemine vers le pôle +. Les substrats restent pratiquement sur la ligne de départ ou cheminent vers le pôle négatif, alors que les produits d'hydrolyse cheminent vers le pôle positif.

Ces résultats ne peuvent pas être interprétés simplement par l'attraction électrostatique entre enzyme et substrat en raison des causes d'erreurs, notamment l'électrosmose, la viscosité et la capillarité. Toutefois, nous signalons que la pepsine, la ribonucléase se comportent comme la papaine lorsqu'on soumet ces enzymes à la microélectrophorèse dans les mêmes conditions.

III

ESSAIS DE PURIFICATION DE LA PAPAINES EN VUE D'ACCROITRE SON ACTIVITE PROTEIDOLYTIQUE

Nous nous sommes proposé d'augmenter l'activité protéolytique des papaines industrielles en essayant de les faire cristalliser.

1^o - Essais basés sur le fractionnement par le sulfate d'ammonium à différents pH

Nous avons suivi la technique de BALLS, LINEWEAVER et THOMPSON (12) qui ont annoncé leurs résultats en 1937, puis ont décrit en 1939, les opérations les ayant conduits à l'obtention de l'enzyme cristallisé.

Ces enzymologistes partent du latex frais du papayer vert de la station d'agriculture expérimentale des Iles Hawaï. Le détail figure dans leur publication : ils activent l'enzyme par le cyanure de sodium, ajustent successivement le pH à 6,5, puis à 9, puis à 8-8,5, en effectuant des fractionnements par le sulfate d'ammonium et des précipitations par le chlorure de sodium. Ils obtiennent un produit dont l'activité n'est pas, semble-t-il considérablement accrue; il est voisin des prolamines et des gliadines des graines végétales, donnant à l'hydrolyse de la proline et de l'acide glutamique

Le poids moléculaire de l'enzyme cristallisé est égal à 33.000. On y trouve 8 groupes NH_2 par molécule, 2,4 p.100 d'azote aminé dosé à l'appareil de WARBURG, 1,2 p.100 de soufre total dont 0,94 provenant de la cystine, 3,7 p.100 de cystine; on n'y décèle pas le phosphore; son absence élimine toute possibilité d'existence d'un acide nucléique.

BALLS et ses collègues donnent aussi deux microphotographies de leurs cristaux de papaine, l'une en aiguilles très fines, l'autre en tablettes plus ou moins hexagonales. Ils constatent que les deux formes ont la même activité enzymatique, que l'oxydation produit une forme inactive de la protéine, mais activable, puis, ultérieurement, une forme définitivement inactivable sans changement matériel apparent des cristaux. Aucune différence de composition chimique de la protéine ne peut être observée entre les deux formes cristallisées ni dans les formes rendues inactivables par l'oxydation.

Nous n'avons pas réussi, par la méthode de BALLS, à obtenir à partir des enzymes industriels des cristaux nets de papaine.

2^e- Essais de concentration par adsorption

Nos dernières fractions par le sulfate d'ammonium selon la technique de BALLS montrant une baisse d'activité plutôt qu'un accroissement, nous avons abandonné cette méthode et essayé l'adsorption sur l'alumine alcaline utilisée par EPPS (35) pour la cristallisation de l'histidine-décarboxylase.

Nous avons utilisé une alumine pour chromatographie de MERCK qui nous a déjà permis, en collaboration avec MORETTI et RIVES (8) de tripler la concentration, dans les urines de femmes enceintes, de l'hormone mélanophoro-dilatatrice active sur la grenouille hypophysectomisée.

Voici le détail du mode opératoire que nous avons suivi :

La poudre de papaine industrielle est mise en suspension dans une solution de borate de sodium 0,05 M, à raison de 40 mg de poudre par ml. On ajuste à $\text{pH} = 8,5$ et laisse en contact 48 heures à 37° en agitant souvent. On centrifuge alors 15 minutes à 5.000 lm .

Le liquide opalescent est ajusté à $\text{pH} = 8$ et on ajoute 25 mg d'alumine de MERCK par ml de liquide. On laisse l'adsorption se poursuivre pendant 48 heures à 15° en agitant fréquemment.

On centrifuge une seconde fois. Le culot est alors lavé une fois par son volume d'eau distillée. On élue deux fois de suite par le sulfate d'ammonium à demi-saturation, on centrifuge et remet le culot en suspension dans la solution de sulfate d'ammonium et en triturant le tout 15 à 20 minutes avec un agitateur après les centrifugations.

Les éluats sont réunis, puis additionnés d'un volume et demi de solution saturée de sulfate d'ammonium et laissés 24 heures à 15° . Le précipité floconneux qui se dépose au fond de l'éprouvette est redissout dans le minimum d'eau bidistillée, puis on ajoute du sulfate

saturé de telle sorte que le titre final représente 0,75 saturation en sulfate à la température de 15°.

On laisse 48 heures à 7°; il apparaît un dépôt microcristallin qui est examiné au microscope polarisant; on voit des cristaux appartenant au système rhomboédrique qui peuvent être confondus avec ceux du sulfate d'ammonium.

On dissout par l'alcool à 70° qui dissout l'enzyme et laisse le sulfate insoluble (solubilité du sulfate d'ammonium dans l'alcool à 70°, 0,2 p.100 à 15°).

La solution alcoolique redonne, par évaporation, les cristaux hexagonaux.

On peut différencier simplement les deux sortes de cristaux: on repère sur lame quelques cristaux, puis porte à 180°-200° modérément sur platine chauffante. Dans ces conditions, les cristaux d'enzyme brunissent et finissent par disparaître, alors que le sulfate d'ammonium fond simplement et reste incolore.

L'adsorption sur charbon, sur phosphate tricalcique, n'a donné aucun résultat; l'élution par le sulfate d'ammonium à demi-saturation n'a donné qu'un liquide clair; aucune floculation appréciable de protéide n'a pu être obtenue en augmentant progressivement les concentrations en sulfate d'ammonium.

L'enzyme obtenu par adsorption sur alumine est environ 2,2 fois plus active que l'enzyme de départ.

3°- Essai de concentration par dialyse

a) Sur viscose:

La dialyse de la papaine délipidée en sac de viscose dans de l'eau bidistillée renouvelée toutes les heures donne un dialysat assez riche en amino-acides, ainsi qu'en témoigne le taux d'azote total et celui d'azote au formol; les réactions de la tyrosine et du tryptophane sont positives. Nous avons utilisé, pour caractériser les traces de ce dernier, la réaction classique de KOVACS, après ensemencement par le colibacille producteur d'indol aux dépend du tryptophane.

Cependant, la viscose laissait notoirement passer trop de substances hydrosolubles et le pouvoir protidolytique n'était guère plus élevé qu'avec la papaine initiale.

b) Sur collodion :

La dialyse en sac de collodion nous a donné un dialysat dont l'extrait sec est beaucoup moins élevé qu'avec la viscose (quelques milligrammes seulement par gramme de papaine initiale). Evaporé sous vide, ce nouveau dialysat donnait une activité 2,5 fois plus élevée que l'enzyme 84.

Il est assez difficile, sans connaître avec certitude le calibre des pores du collodion, d'affirmer à quelle grosseur moléculaire s'arrête la dialyse.

L'obtention des préparations enzymatiques actives par dialyse et, encore mieux, l'obtention d'enzymes cristallisés entièrement dialysables laisse planer une énigme sur la constitution réelle des enzymes.

Pour les enzymes dialysant (pepsine, trypsine, chymotrypsine, carboxypeptidase, uréase, papaine) de nature protéique et susceptibles de cristalliser tout en restant très active, voire même d'activité accrue l'apoenzyme semble inutile, si du moins on qualifie d'apoenzyme le substrat colloïdal ne dialysant pas. Le caractère de facteur indispensable qui lui a été attribué, doit être à notre avis, minimisé dans le cas des protéinases n'agissant que sur des substrats protidiques. Il est difficile de dire si le coenzyme est seul capable d'agir, puisque, pour mesurer son activité, on lui ajoute un substrat protidique, évidemment non spécifique, mais qui peut parfois se comporter comme apoenzyme activateur.

4°. Essai de cristallisation directe

Un autre essai de cristallisation a été tenté à partir de solutions aqueuses d'enzyme très concentrées maintenues 72 heures au moins à 5°C. On part d'une dilution de papaine 84 à 25 p.100 qu'on laisse à la glacière sous couche de toluène dans des éprouvettes hautes à fond conique. De fins cristaux d'aiguilles blanches commencent à se déposer dès la 24^{me} heure. Ces cristaux conservent un haut pouvoir protidolytique (et aussi antibiotique).

En les purifiant par dialyses successives, l'activité décroît. On peut se demander s'il s'agit bien de cristaux d'enzyme ou de sels insolubles alcalino-terreux des amino-acides propres de l'enzyme.

Pour répondre à cette question, nous avons simplement incinéré les cristaux obtenus par dernière dialyse. Le taux des cendres résiduelles est resté de l'ordre de 6 p.100, ce qui élimine l'hypothèse des sels terreux. En conséquence, il semble bien qu'il s'agisse de cristaux d'enzyme.

La photographie ci-dessous montre ces cristaux, en forme d'aiguilles, qui ressemblent à ceux de BALLS.



Leur étude au microscope électronique, à grossissement 20.000, n'a pas permis de les rattacher de manière certaine au système monoclinique ou au système quadratique.

Leur diagramme de DEBYE-SCHERRER n'a rien révélé de caractéristique.

RESUME ET CONCLUSIONS DU CHAPITRE III

Nos recherches nous conduisent aux conclusions suivantes :

1°) L'origine, la définition et la composition de la papaine ou mieux, de la papainase, ont été précisées.

2°) La papainase dialyse et peut être obtenue cristallisée.

Par adsorption et par dialyse, on peut multiplier par 2,2 ou 2,5, l'activité protidolytique.

3°) Une hypothèse de l'action des enzymes est entrevue d'après l'étude des diagrammes de microélectrophorèse sur papier.

L'enzyme pourrait se fixer sur le substrat par attraction électrostatique sous l'effet des cations valentiels.

4°) Une hypothèse restrictive sur le rôle fondamental de l'apoenzyme est envisagé dans le seul cas des protéinases.

Chapitre IV

ETUDE DE QUELQUES FACTEURS DE L'HYDROLYSE PAPAINIQUE

I

Le pH

1°- Optimum du pH

Afin de pouvoir comparer l'action protidolytique de la papaine sur divers substrats, ceux-ci ont été préparés à la même concentration de protides sèches, dissous uniquement dans des tampons aux phosphates monopotassique et disodique de SOERENSEN, en solution M dans l'eau bidistillée bouillie et refroidie.

15

Nos différents échantillons de papaine plus ou moins purifiés ont été ajoutés en même quantité aux différents substrats. Tous les essais ont été pratiqués en Erlenmeyer bouchés à l'émeri et, pour des raisons de commodité, au même thermostat à 56°. Des prélèvements précédés d'agitations énergiques ont été pratiqués de quart d'heure en quart d'heure pour suivre l'hydrolyse par la réaction du biuret. Après six heures d'hydrolyse enzymatique, les échantillons retirés du thermostat et refroidis furent soumis aux examens suivants : lecture polarimétrique, formol-titration par électrométrie et réaction du biuret. La polarimétrie fut retenue pour la fibrine et pour la gélatine, le formol-titration et le biuret pour les autres substrats.

Les concentrations suivantes furent choisies :

Substrat	1,25
Tampon	50 ml
Enzyme en poudre	0,050

Nous avons été amené à diminuer la concentration de substrat conseillée par WILLSTAETTER (qui préconise une concentration de gélatine de 6,66 p.100) et d'accroître la concentration d'enzyme choisie par FROSSARD ainsi

que par le Codex, pour obtenir des écarts plus importants entre chaque prélèvement.

Nos différents substrats avaient les origines suivantes:

Fibrine de porc desséchée HOFFMANN-LAROCHE et du L.N.C.M.; ovalbumine sèche en plaquettes RIJNIE-POULENIG; gélatine en poudre HOFFMANN-LAROCHE; caséine industrielle incomplètement déglucidée; collagène de queues de rats préparé par BRISON, zéine d'origine indéterminée.

D'après l'opinion de nombreux biochimistes et microbiologistes qui utilisent de préférence cette diastase à la pepsinase ou à la trypsinase pour préparer leurs bouillons et milieux de culture, la papaïne "agit en milieu neutre", ce qui évite ainsi une remise à pH = 7 par des neutralisations subséquentes.

Cette opinion est encore exprimée par PERROT (80) et, récemment encore, BOULANGER ne voulant pas préciser si la papaïne agit en milieu acide, sur les cations protéitiques ou, en milieu alcalin, sur les anions protéiques, résoud le problème par le "ZWITTER ION" de la molécule protéique (20) que la papaïne pourrait attaquer. On sait que l'ion double, ion hybride, ou ZWITTER ION de la molécule protidique serait dû à l'équilibre électrostatique, au point isoélectrique des ions NH_3^+ et COO^- . Par suite d'une chélation du cation polariseur vers le gros anion, la molécule ion-hybride conduit au minimum le courant électrique. La solvation maximum de l'ion-hybride justifie la sélectivité de l'action fractionnaire en ce point de l'enzyme. A ce point, la chélation conduit à une cyclisation par les acides aminés, ce qui explique l'intensité des réactions à la ninhydrine dans les hydrolysats papainiques autres que ceux de la gélatine.

Il faut reconnaître que toutes nos mesures présentent une cause d'erreur du fait de la présence des tampons qui, d'après THOMAS (105) font varier le point isoélectrique des protéines. FLEURY, en 1924, (38) écrivait: "L'activité des diastases est étudiée par addition d'anions et de cations... Or, l'activité est influencée d'une façon ou d'une autre par addition d'un sel. Dans de telles expériences, on fait donc inévitablement varier deux facteurs et il peut être souvent fort délicat de distinguer la part exacte qui revient à chacun d'eux dans l'activité constatée".

Dans les expériences mentionnées ci-dessus, nos 50 ml de tampon contiennent de 4 à 500 mg d'électrolytes pour 50 mg seulement d'enzyme et 1500 mg de substrat, soit 30 p.100 environ de sels. On ne peut nier l'importance de leur interférence, comme on interprète difficilement d'ailleurs le soin de nombreux auteurs, comme FROSSARD s'efforçant d'éliminer "toute trace d'électrolyte" dans 5 mg d'enzyme, afin de "supprimer leur effet tampon". Or, ce ne sont pas les électrolytes de 5 mg d'enzyme dialysé placé dans un milieu contenant 4 à 500 mg de phosphates (36) qui peuvent apporter une perturbation redoutable.

Concluons avec HAHN qu'il faut être prudent dans l'emploi des tampons, "qu'il faut les manier, quand on ne peut faire autrement qu'à des doses aussi réduites que possible" et, avec BOULANGER (20) qu'on voit "combien l'interprétation de tous ces résultats peut être délicate et quelles éventualités multiples peuvent être envisagées".

Voici, par ailleurs, les points isoélectriques des principaux substrats:

Laine	3,4	Pigments respiratoires	
Caséine	4,3		
Sérum globuline	4,5 à 5		
Ovalbumine	4,55	Hémocyanine	4,5 à 5,0
Tryoglobuline du porc	4,58	Erythrocrucorine	4,5 à 5,2
Soie	4,6	Ferment jaune	5,25
Gélatine	4,7	Oxyhémoglobine	6,75 à 6,81
Sérum albumine	4,7-4,8	Carboxyhémoglobine	6,92
Lactalbumine	5,12	Hémoglobine réduite	8,81
Gluténine	5,4		
Gliadine	6,5		
Édestine	7		
Myoglobuline	7		
Fibrine	7,2		

Nous avons déterminé les pH optimum des substrats, qui résultent des mesures faisant l'objet du tableau n°1 :

Tableau n°1 :

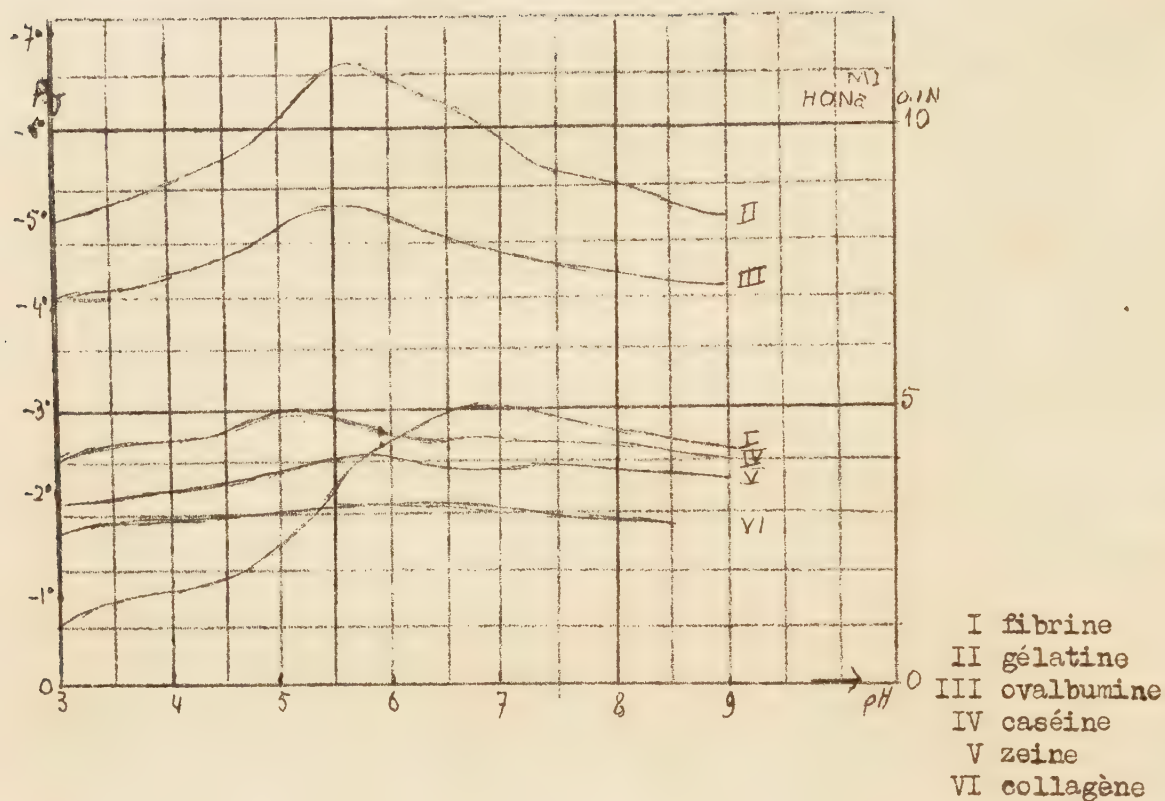
pH	Déviation polarimétrique		Formol-titration ml HONa 0,1N			
	Fibrine	Gélatine	Ovalbumine	Caséine	Zéine	Collagène
Phtalate 3	-0°45'	-5°16'	7,0	4,2	3,5	2,9
3,5	-0°55'	-5°20'	7,1	4,3	3,5	2,9
4	-0°58'	-5°23'	7,3	4,3	3,6	2,9
4,5	-1°10'	-5°35'	7,5	4,5	3,6	3
Phosphates 5	-1°35'	-6°10'	8,4	5	3,9	3,2
5,5	-2°20'	-6°40'	8,6	4,8	4,1	3,3
6	-2°40'	-6°30'	8,3	4,7	4,1	3,2
6,5	-2°58'	-6°20'	8	4,5	3,9	3,1
7	-2°58'	-5°50'	7,8	4,5	3,9	3,1
7,5	-2°54'	-5°38'	7,7	4,4	3,9	3
8	-2°50'	-5°25'	7,5	4,3	3,8	2,9
8,5	-2°36'	-5°10'	7,3	4,3	3,7	2,8
9	-2°23'	-5°0'	7,3	4,2	3,7	

Le temps de l'hydrolyse a été uniformément fixé, soit 6 heures.

N.B.- Pour la gélatine, la rotation est diminuée de la rotation donnée par les tampons sur le substrat.

Les courbes ci-après représentent ces résultats:

Hydrolyse papainique :



Nos résultats montrent en définitive, un optimum aux pH suivants pour l'hydrolyse papainique :

Fibrine	6,5 à 7
Gélatine	5,5 à 6
Ovalbumine	5 à 6
Caséine	5
Zeine	5,5 à 6,5
Collagène	5,5

2°- Variation du pH d'une solution de gélatine
au cours de l'hydrolyse papainique en milieu tamponné

La difficulté de chiffrer les variations du pH consécutives à l'hydrolyse papainique nous a incité à suivre cette dernière en présence de tampons.

Nous sommes parti d'une solution de gélatine extra-transparente à 2,5 g p.100 qu'on a soumise à l'action de 5 mg d'enzyme par 100 ml de substrat.

Les mesures du pH ont été pratiquées à l'électrode de verre des potentiomètres de CARPENT-CONSTANS et de QUERE, après action de l'enzyme trois heures à 56°C.

Tableau II :

Tampons		pH après 3 heures
Phtalate	3	3,81
	3,5	4,20
	4	4,42
	4,5	4,89
Phosphates $\frac{M}{15}$	5	5,43
	5,5	5,77
	6	5,96
	6,5	6,31
	7	6,77
	7,5	7,18
	8	7,23
	8,5	7,31
	9	7,40

L'interprétation de ces résultats est malaisée en raison de la présence des tampons, de protéides et de la viscosité relative du milieu au voisinage de l'électrode de verre. Cependant, il n'est peut-être pas inexact d'écrire que la somme algébrique ionique des molécules obtenues par hydrolyse de la gélatine en présence d'un excès de substrat non hydrolysé est très voisine de pH = 5,9 puisque le tampon 6 est à peine modifié (5,96). Ceci peut nous permettre de considérer que l'optimum de pH, 5,5 à 6, correspond sensiblement au pH global fourni par la somme (produits d'hydrolyse + substrat non hydrolysé).

3°- pH et potentiels d'oxydo-réduction atteints au cours de la protidolyse papainique prolongée

Les substrats suivants, fibrine, gélatine, ovalbumine, caséine, collagène ont été essayés en solution dans l'eau bidistillée au thermostat à 56°C. Toutes les concentrations ont été ramenées à :

1 gramme de substrat
10 mg de papaine
100 ml d'eau bidistillée

Les mesures électrométriques de pH et de potentiel d'oxydo-réduction ont été pratiquées au potentiomètre de CARPENT-CONSTANS, puis de QUERE à corrections de températures automatiques.

Tableau III ../

Tableau III :

Temps	Fibrine		Gélatine		Ovalbumine	
	pH	MV	pH	MV	pH	MV
0	6,90	+470	5,80	+460	6,10	+460
2 h.	6,61	+460	5,70	+400	5,90	+450
4 h.	6,55	+370	5,50	+400	5,80	+400
8 h.	6,05	+350	5,50	+380	5,70	+380
12 h.	5,98	+350	5,40	+370	5,60	+360
18 h.	5,95	+340	5,40	+360	5,60	+360
24 h.	5,80	+340	5,30	+360	5,60	+360

Ces résultats présentent de l'intérêt pour la deuxième partie de notre travail. Nous avons pratiqué les mesures pendant 8 jours, mais, à force de prélever, même aseptiquement le liquide des éprouvettes, la contamination bactérienne vient sûrement perturber les résultats et les chiffres obtenus après 24 heures ne peuvent plus être retenus.

Le potentiel a été mesuré à l'électrode de platine opposée à l'électrode de calomel, le vase de mesure étant soumis à un barbotage d'azote. Les chiffres notés pour chaque prélèvement ont été ceux lus après 15 minutes de contact entre le milieu en expérience et les électrodes plongeant directement dans le liquide, la jonction étant assurée par un tortillon d'amiante surmonté d'une solution saturée de chlorure de potassium en surpression de 10 cms au moins.

II

IA TEMPERATURE

Optimum thermique des réactions de protidolyse Selon la nature des substrats

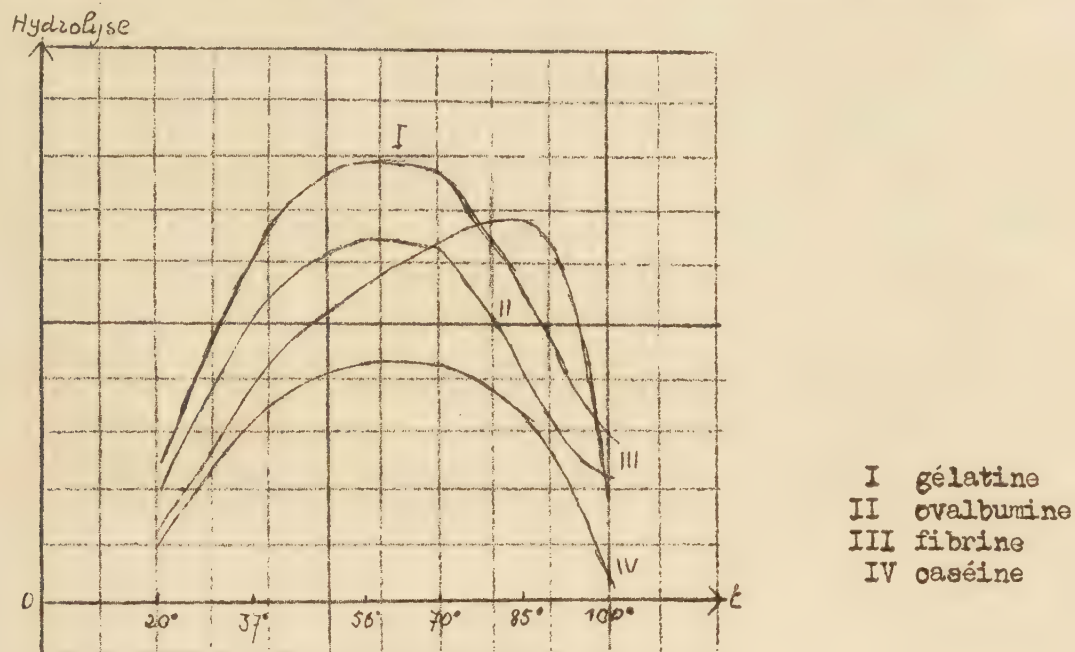
WILLSTAETTER (112) opère dans un thermostat à 40° pendant deux heures. le Codex Français préconise 70°. Nous avons travaillé à température intermédiaire, soit à 56° dans une étuve à double paroi, chauffée par bain d'eau, telle qu'on en trouve dans tous les laboratoires de biologie.

Il nous a été facile, toutefois, de comparer les résultats au thermostat, fonctionnant en même temps à :

40°
56°
70°
85°
100°

sur les protides: fibrine, ovalbumine, gélatine, caséine.

Les courbes ci-dessous établies avec les températures en abscisses et les intensités de l'hydrolyse en ordonnées, sont significatives:



On peut en déduire les optimum thermiques suivants :

Courbe I	Gélatine	60°C
" II	Ovalbumine	56°-60°C
" III	Fibrine	75°-80°C
" IV	Caséine	60°-70°C

III

ESSAIS D' IDENTIFICATION DES MOLECULES LIBEREES PAR LA PROTIDOLYSE PAPAINIQUE

Cette partie de la biochimie restera longtemps à l'ordre du jour, puisqu'elle renseigne sur le mode d'action de l'enzyme et permet, par suite, de se faire une idée de la constitution propre de l'édifice protidique.

Nous avons cité, dans l'historique du début de ce travail, les principales acquisitions et nous n'avons pas l'intention de présenter ici des résultats qui, pour être approfondis, mériteraient le travail d'équipes de chercheurs pendant plusieurs années.

Nous nous sommes limité à la caractérisation d'amino-acides et de peptides dans les hydrolysats papainiques, par voie chimique classique, et

par microélectrophorèse et chromatographie comme pour les solutions des enzymes eux-mêmes.

La caractérisation chimique nous a conduit à une constatation expérimentale que voici : alors que les hydrolysats papainiques de fibrine, de caséine, d'ovalbumine, de gélatine donnent une coloration violette intense au biuret, les trois premiers seuls donnent la réaction à la ninhydrine au bout de une minute à 100°, la gélatine ne donnant la réaction qu'après un temps beaucoup plus long. Par conséquent, l'hydrolyse de la gélatine ne serait pas conduite rapidement jusqu'au stade amino-acide par l'enzyme alors qu'elle y aboutirait pour la fibrine, la caséine et l'ovalbumine.

Nous insisterons, dans la seconde partie, sur la présence d'acide succinique dans les hydrolysats papainiques.

La caractérisation par microélectrophorèse sur papier montre une prédominance d'une fraction attirée par le pôle + dont nous avons parlé à propos de l'hypothèse du mode d'action des enzymes sur le substrat.

Les chromatogrammes uni et bidimensionnels sur papier des hydrolysats de fibrine et de gélatine, confirment l'existence de peptides à poids moléculaires peu élevés.



fibrine L.N.C.M.

hydrolysat témoin

CONCLUSIONS DU CHAPITRE IV

En utilisant les méthodes décrites au chapitre II de la première partie, notamment la polarimétrie, la formol-électrotitration, les réactions colorées classiques, il est apporté une contribution expérimentale :

- 1°) A la fixation de l'optimum du pH d'activité protidolytique sur les substrats : fibrine, gélatine, ovalbumine, caséine, zéine, collagène.

A la variation du pH en milieu tamponné d'une solution de gélatine soumise à l'enzyme.

Aux pH et aux potentiels d'oxydo-réduction atteints au cours de la protidolyse papainique prolongée.

- 2°) A l'optimum thermique de la protidolyse selon les substrats.
- 3°) A l'identification des molécules libérées par la protidolyse papainique.

DEUXIEME PARTIE

LA PAPAINE
SON ROLE DANS L'INHIBITION
ET LA CROISSANCE MICROBIENNE



Chapitre I

I N T R O D U C T I O N

Si l'action enzymatique de la papaine est classique, il n'en est pas de même de son rôle vis à vis des microbes que nous croyons être l'un des premiers en collaboration avec RIGAUD et BRISOU (92), à avoir signalé.

Elle peut inhiber la croissance de quelques-uns d'entre eux, ou, au contraire, favoriser celle de certains autres.

Sur le premier point, c'est-à-dire l'action antibiotique, nous rappellerons, tout d'abord, les principales méthodes de mesure du pouvoir antibiotique en général, indiquant ensuite comment nous avons pu mettre en évidence et apprécier celui de la papaine. Nous indiquerons ensuite nos essais de concentration en vue, cette fois-ci, d'augmenter le pouvoir antibiotique, et nous envisagerons l'influence de différents facteurs physiques et chimiques en vue d'expliquer cette propriété.

Nous nous sommes demandé enfin si d'autres enzymes protidolytiques sont susceptibles d'exercer eux-mêmes l'action bactériostatique.

Dans les chapitres suivants, nous traiterons de l'action favorisante de la papaine, sur la croissance des anaérobies. Nous insisterons sur le rôle des principaux réducteurs qu'elle renferme ou qu'elle produit, notamment les succinates; nous attirerons l'attention sur son rôle collagénasique, et à la lumière de nos résultats, nous émettrons quelques opinions en contradiction avec celles qui sont admises jusqu'ici en matière d'oxydo-réduction et nous exposerons quelques considérations nouvelles sur l'anaérobiose.

GENERALITES

La littérature scientifique est souvent imprécise sur la définition du terme d'antibiotique; elle demande, semble-t-il quelques éclaircissements.

En 1946, SANNIE (97), dans une étude sur les substances antibiotiques des champignons et des bactéries, se rapportant aux mémorables découvertes de FLEMING, parle indifféremment de substances antibactérienne et antibiotique.

THOMAS (105), FLORENCE et ENSELME (40), LOISELEUR (67), GORIS-LIOT, JANOT et GORIS (47), LESPAGNOL (64) dans leur manuels classiques ne donnent aucune définition. LEBEAU et ses collaborateurs (58) désignent par antibiotique "une substance entraînant la destruction complète des germes et des spores, sans possibilité de développement ultérieur".

MACHEBOEUF et GROS (70) décrivent un antibiotique comme une "substance injectée à dose infime dans un organisme animal infecté par des bactéries, pouvant nuire à celles-ci sans nuire à l'animal". C'est cependant une définition qui pourrait s'appliquer à tout médicament toxique pour les bactériés, non toxique pour l'organisme que l'on désire protéger.

Pour JAULMES, JUDE et QUERANGAL des ESSARTS (57), est bactériostatique toute substance qui empêche le développement des bactéries et est antibiotique celle qui les tue. Pour la définition du bactériostatique dont les sulfamides sont l'exemple, il n'y a rien à dire, mais convenons que pour celle de l'antibiotique, elle ressemble trop à celle de l'antiseptique.

POLONOVSKI (83) considère comme antibiotique "des produits inhibant le développement des bactéries par opposition aux antiseptiques qui sont bactéricides". POLONOVSKI confond donc antibiotique et bactériostatique.

La définition qui nous paraît la meilleure est empruntée à un ouvrage de WAKSMAN intitulé "Antagonismes microbiens et substances antibiotiques" (110) où une substance antibiotique est définie comme "substance chimique produite par des organismes animaux ou végétaux, ayant la propriété d'inhiber le développement des micro-organismes et parfois de les détruire", tandis qu'un bactériostatique est un facteur ou un ensemble de facteurs limitant le développement des micro-organismes dans un milieu. Dans le cas où l'antibiotique détruit les micro-organismes, il se comporte, à notre avis comme antiseptique.

WAKSMAN classe ensuite les substances antibiotiques connues en 1848 en substances produites par les bactéries, par les actinomyètes, par les champignons inférieurs, par des champignons supérieurs, par des algues, des plantes supérieures, des animaux. Il ne mentionne pas les sucs végétaux et animaux et, à aucun moment semble-t-il son attention n'a été attirée par les latex.

Or, le suc du papayer est d'un usage immémorial dans la zone tropicale pour le traitement de nombreuses dermatoses aiguës. Nous allons prouver que la papaine se comporte parfois comme antibiotique .

Chapitre II

MESURE DU POUVOIR ANTIBIOTIQUE

Nous avons utilisé les méthodes classiques qui peuvent se diviser en,

A - Méthodes directes:

- a) Méthode des cercles d'inhibition de HEATLEY,
- b) Méthode des dilutions,
- c) Méthode des stries,
- d) Néphélométrie des suspensions microbiennes,
- e) Pesée des microbes.

B - Méthodes indirectes à l'aide d'indicateurs :

1°) Indicateurs d'oxydo-réduction :

- a) Méthode au bleu de méthylène de PENNANEAC'H, MORAND, GUENNEC (80).
- b) Méthode au vert de Janus de PREVOT de l'Institut Pasteur, utilisant le pouvoir inhibiteur de l'antibiotique sur la réduction du vert de JANUS, par les cultures de *W. perfringens* (88).

2°) Indicateurs de pH :

- Méthode au glucose.

A

METHODES DIRECTES

a) Méthode des cercles d'inhibition de HEATLEY

Pour comparer l'activité bactériostatique de la papaine à celle des autres antibiotiques connus, comme la pénicilline, la streptomycine, la thyrothricine, la méthode de HEATLEY, calquée sur la méthode qualitative de FLEMING, a été tout d'abord utilisée.

Dans des boîtes de PETRI de moyenne dimension (15 cms) ou grande dimension (20 à 25 cm de diamètre), stérilisées à l'autoclave, on verse une solution chaude, stérilisée également à l'autoclave, de bouillon de viande gélosé à 2 gr par litre, de façon à former une couche de 5 à 6 mm d'épaisseur. Aussitôt après, on recouvre du couvercle également stérile et laisse refroidir. On change de couvercle après refroidissement pour éviter la chute des gouttes d'eau condensées et après refroidissement de la gélose, on y enfonce verticalement, à une profondeur de 2 à 3 mm environ, une demi-douzaine de tubes de verre de 6 mm de diamètre intérieur et de 8 mm de long portés préalablement au four POURINEL.

On peut remplacer les tubes par des dénivellations cupuliformes produites à l'aide du fond de petits tubes à hémolyse stérilisés sur la surface de la gélose au moment de la prise en masse.

On verse dans deux micro-tubes 0,20 ml. de la solution de papaine à examiner et dans quatre autres, 0,20 ml de dilutions croissantes de pénicilline correspondant à 500, 250, 100, 50 unités de l'antibiotique. On dépose alors sur la gélose une dilution de milieu de culture contenant des staphylocoques dorés de la souche *S. aureus* Oxford. Il suffit de 3 à 5 ml de bouillon dilué qu'on répartit aussi uniformément que possible sur toute la surface de la gélose et jusqu'aux abords des petits tubes ou jusqu'au bord immédiat des cupules. On recouvre la boîte de PETRI et porte aussitôt à l'étuve en notant l'heure exacte.

Pendant les deux premières heures, on n'observe qu'un voile à la surface des boîtes. A partir de la 8^{me} heure, les colonies se précisent et prennent peu à peu la teinte dorée caractéristique. On lit la bactériostase à la 24^{me} heure et compare les diamètres des zones d'inhibition du tube à papaine, d'une part et des tubes à pénicilline d'autre part.

La technique a été répétée plusieurs fois avec la papaine 84 et a fourni la preuve de l'existence dans nos échantillons d'un principe antibiotique qui n'est pas uniquement bactériostatique. En effet, des prélèvements effectués au voisinage - à un ou deux millimètres des tubes - dans la zone d'inhibition et repiqués sur bouillon gélosé ordinaire, n'ont pas redonné de culture de *S. aureus*. A l'action bactériostatique, s'ajoute une bactériolyse. D'après la définition de WAKSMAN, le papaine est donc

antibiotique vis-à-vis du S.aureus. Toutefois, la bactériolyse étant faible, nous retiendrons aussi souvent dans la suite l'expression bactériostatique plutôt qu'antibiotique.

Comme pour la pénicilline, la bactériostase fut observée pendant plusieurs jours. A la 48^{me} heure, des formes plus petites de colonies apparurent à la lisière intérieure de la zone^{de} bactériostase. A la 72^{me} heure, le diamètre de bactériostase, initialement de 32 mm, n'était plus que de 20 mm; à la 96^{me} heure de 12 à 14 mm. Au 5^{me} jour, les microcolonies étaient au contact des tubes, preuve indiscutable de l'adaptation des microbes au milieu contenant l'antibiotique, ou de la bactériorésistance des souches les plus jeunes ou, comme nous le verrons plus loin, de la synthèse microbienne d'un facteur de croissance.

La teneur en principe bactériostatique de la papaine sur S.aureus fut trouvée égale à 125 unités Oxford par gramme de poudre, ce qui est l'indice d'une faible bactériostase.

b) Méthode des dilutions

On opère ici en tubes genre tubos à essais de 10 cm de haut, 10 mm de diamètre, porteurs d'une génératrice noire parallèle à l'axe du cylindre. Dans une série de tubes, on verse un même volume de bouillon ordinaire et II à III gouttes de dilution de cultures^{de} staphylocoques. On ajoute des quantités décroissantes de solution de papaine, et des quantités croissantes d'eau bidistillée pour maintenir le volume constant. On porte tous les tubes à 37° et on les examine après 24 heures. On note à quelle dilution la culture commence à apparaître et à troubler le contenu du tube.

On peut très facilement comparer la dilution de papaine à une dilution de pénicilline G. cristallisée.

Les résultats fournis par cette technique sont moins probants que les précédents car la difficulté d'appréciation du trouble la rend moins sûre, mais la détermination est plus aisée.

c) Méthode des stries

La méthode des stries n'est qu'un artifice de microbiologiste permettant de comparer des dilutions d'antibiotiques sur une souche standard de germes. Nous n'insisterons pas sur la description.

d) Néphélométrie des suspensions microbiennes

Dans la méthode des dilutions, il y a intérêt à apprécier le début de la culture. La néphélométrie des suspensions a fait l'objet de très nombreux travaux et nous n'indiquerons ici que nos remarques personnelles. La détermination de la concentration en microbes au milieu de culture

suppose d'abord ce milieu homogène, ce qui n'est exact, conformément à la loi de STOKES, que si les microbes et le milieu ont même densité, ce qui recule longtemps la sédimentation. Par ailleurs, plus la culture est abondante, plus l'effet Tyndall sera intense et plus il y aura de lumière diffusée.

Des résultats moyens ont été fournis par le photomètre de VERNES, ils sont moins satisfaisants semble-t-il, avec la cuve horizontale de l'électrophotomètre de MEUNIER, encore moins avec la cuve verticale de ce même appareil, meilleurs enfin, avec l'appareil de DOGNON, le diffusio-absorptiomètre. Notons, au passage, qu'en comparant entre eux deux ou trois tubes dont l'un est étalon, la néphélémétrie des suspensions microbiennes est préférable à l'observation directe; par contre, la comparaison avec une courbe néphélémétrique étalon établie à un certain moment et à un certain état de la vie des cellules photo-électriques et des filtres, n'est convenable qu'à la condition de vérifier assez souvent l'exactitude de la courbe.

e) Pesée des microbes

Cette méthode plus longue, donne des résultats plus réguliers. Il suffit de centrifuger longuement les tubes de culture pour bien agglomérer les culots au fond des tubes, de laver trois fois ces culots à l'eau physiologique, deux fois avec de l'eau bidistillée, enfin, de sécher à l'acétone après deux nouvelles centrifugations et séjour 30 minutes à l'étuve à 55°C.

C'est une méthode empirique, peut-être, mais qui donne des résultats plus réguliers, surtout si l'on utilise une microbalance.

B

METHODES INDIRECTES A L'AIDE D'INDICATEURS

1°) Indicateurs d'oxydo-réduction

Les méthodes indirectes à l'aide des indicateurs se répandent de plus en plus. A vrai dire, l'utilisation des indicateurs se pratique en même temps que la néphélémétrie.

Le choix de l'indicateur devrait être fonction du potentiel de la culture. Pratiquement, il n'y a pas de règle édictée: on emploiera le bleu de méthylène selon PENNANEAC'H-MORAND-GUENNEC pour les cultures aérobies (80); et le vert de JANUS, selon PREVOT pour les anaérobies. Il n'y a plus alors qu'à choisir le germe réactif, staphylocoque ou streptocoque pour le bleu de méthylène, clostridium pour le vert de JANUS.

Voici comment il convient d'opérer :

Dans des tubes à essai contenant le bouillon de culture, la dilution de microbes réactifs et l'antibiotique à titrer, on ajoute IV gouttes de bleu de méthylène à 1/10.000 ou IV gouttes de vert de JANUS à 1/1.000. (Pour les tubes à clostridium, anaérobies, on désaère au passage à la cloche à vide et recouvre par 2 à 3 mm d'huile de paraffine). On porte les tubes ainsi préparés à l'étuve à 37° et laisse en culture pendant 12, 24, 36, 48 heures. La culture est appréciée par décoloration du bleu de méthylène ou le deuxième virage du vert de JANUS, passage du rose légèrement violet à l'incolore. Là où l'antibiotique agit ou commence à agir, la coloration est maintenue. Avec les clostridium, on peut commencer à apprécier dès la 2^{me} heure.

2°) Indicateurs d'acidité

Le simple artifice pour s'assurer s'il y a culture ou non, donc si l'antibiotique commence à agir dans un tube et pas dans un autre, consiste à ajouter dans le substrat de culture du glucose à partir duquel la plupart des germes microbiens produisent des acides. Il suffit d'ajouter un indicateur de pH comme la phénolsulfone phtaléine à 1 p.100 ou la fuschine acide de RIEDEL décolorée par une quantité juste suffisante de HONa 0,1N, puis 0,01N. La décoloration du premier indicateur et la recoloration du second sont les indices de la production d'acides et donc, du développement microbien; les tubes où les microbes ne poussent pas, ne subissent aucune variation.

Ces différentes méthodes appellent quelques remarques. Leur précision est celle de tous les dosages biologiques et les erreurs sont d'autant plus faibles que les expériences sont plus nombreuses et comportent des souches microbiennes bien standardisées, raison qui en a imposé le choix.

Pour cette dernière question qui avait fait l'objet de la part de BREWER (21), dès 1942, de remarques pertinentes quand à l'usage et à l'abus du S.aureus, tous les auteurs sont unanimes et conseillent des germes aussi bien étalonnés que possible, comme le Staphylo-Oxford (n°6.571 N.R.R.L.B. 314 de la Nationale Collection of Type culture du Lister-Institute de Londres) ou le Staphylococcus aureus n°B-313 (Institut Pasteur, Paris), germe-test retenu par le Codex Français de 1949 pour le dosage des pénicillines.

Le germe doit être très sensible et repiqué récemment, sans quoi, les résultats quantitatifs perdent toute leur valeur. Nous avons rencontré de nombreux échecs avec les souches de clostridium de croissance insuffisamment active.

Chapitre III

ROLE ANTIBIOTIQUE DE LA PAPAINE

Nous avons prouvé l'existence d'un antibiotique dans la papaine par la répétition d'une expérience du type de celle de FLEMING vis-à-vis du *S. aureus* et chiffré cette activité antibiotique par gramme de papaine.

Cette expérience préliminaire demandait évidemment une étude plus poussée. C'est pourquoi nous avons déterminé le spectre bactériostatique de la papaine.

Un certain nombre de souches microbiennes ont été essayées en vue de leur détermination de leur bactériostase par des solutions de papaine délipidée à 10 p.100 en bouillon de viande, tyndallisées, ajoutées au milieu en expérience de telle sorte que la concentration finale en enzyme soit de 1 p.100 dans le bouillon de culture.

On met donc en expérience :

0,5 ml de solution de papaine à 10 p.100,

4,5 ml de tampon,

III gouttes de bleu de méthylène à 1 p.5.000

Après ensemencement, on isole par une couche de 2,5 mm d'huile de paraffine.

Afin d'éliminer l'acidité produite par la protidolyse, tous les essais ont été pratiqués en milieu tamponné à pH = 7,0 par des tampons phosphates ou citrate de sodium M/15, dans des milieux de bouillon de viande peptonés sans glucides.

Chaque germe a fait l'objet d'un essai de culture témoin dans les mêmes conditions.

Comme les premières souches testées étaient presque toutes aérobies, l'indicateur choisi fut le bleu de méthylène qui se décolore à pH = 7,0 à partir de + 0,011 v, dans les cultures ne contenant pas d'antibiotique et reste coloré dans le cas contraire.

Tableau :

GERMES ESSAYES	RESULTATS
<u>A) Résultats positifs :</u>	
1) Staphylococcus aureus Souche Pasteur	72 heures de bactériostase
2) Staphylococcus aureus Londres-Etalon	72 " " "
3) Streptococcus faecalis	Début de culture lente par la suite. Culture normale au 5 ^{me} jour. Microculture à la 24 ^{me} heure. Culture normale par la suite.
4) Streptococcus hemolyticus C	Pas de culture.
5) Brucella abortus suis	Aucune culture même après la 96 ^{me} heure.
6) Salmonella typhi Eberth	72 heures de bactériostase. Culture grêle à la 96 ^{me} heure.
7) Salmonella paratyphi A	Culture lente à partir de la 48 ^{me} heure.
8) Salmonella paratyphi C	Culture ralentie, débutant vers la 48 ^{me} heure.
9) Shigella dysenteriae	Aucune culture en 24 heures.
10) Shigella paradysenteriae Flexner V	" " " " "
11) Shigella paradysenteriae Flexner W	" " " " "
12) " " " Flexner X	" " " " "
13) " " " Flexner Y	" " " " "
14) " " " Flexner Z	" " " " "
15) Paracolibacille (coliforme)	Culture très ralentie, ne débutant que vers la 72 ^{me} heure.
<u>B) Résultats négatifs:</u>	
1) Bacillus subtilis	Culture rapide
2) Salmonella paratyphi B, type Schottmuller	Culture normale
3) Salmonella enteritidis (Gartner)	" "
4) Salmonella typhi murium (Aertrycke)	" "
5) Proteus OX 2	" "
6) Proteus OX 19	" "
7) Pseudomonas aeruginosae, var, cyan	" "
8) Escherichia coli	" "

D'après ce tableau, on voit que la papaine est douée d'un pouvoir bactériostatique net pour un certain nombre de germes, qu'ils soient Gram négatifs ou Gram positifs. Parmi les plus sensibles, se placent le staphylocoque, quelques streptocoques et pour les bactéries de l'intestin, le bacille d'EBERTH et les Shigella.

Le bacille coli, contrairement à ce qu'on espérait, a poussé normalement en présence de la papaine, mais ceci se comprend, si l'on considère l'extrême polymorphisme et la facile adaptation de ce germe, de même que sa croissance dans les zones intermédiaires d'aéro-anaérobiose. Les microbiologistes donnent aussi comme autre raison valable l'aptitude particulière du coli-bacille à la synthèse d'amino-acides aux dépens de substrats protidiques.

Chapitre IV

RECHERCHES SUR LES VARIATIONS DU POUVOIR ANTIBIOTIQUE

I

ESSAIS D'ACCROISSEMENT DU POUVOIR ANTIBIOTIQUE

a) Par purification de la papaine

Il était logique, chaque fois que nous avons essayé de concentrer le pouvoir protidolytique de l'enzyme, de vérifier en même temps si les fractions plus actives comme enzyme l'étaient également comme antibiotiques.

Au cours de la tentative, infructueuse d'ailleurs, d'obtention de l'enzyme cristallisé par la méthode de BALLS, nous avons constaté que le pouvoir antibiotique avait complètement disparu dans les dernières fractions, vraisemblablement à cause de l'action de l'oxygène au cours des diverses manipulations.

D'autre part, la fraction cristallisée sédimentée à froid à partir des solutions très concentrées d'enzyme, suivant notre technique qui a été décrite dans la première partie, ne nous a pas donné, contrairement à ce que nous espérions, d'accroissement du pouvoir antibiotique.

Au contraire, de meilleurs résultats furent obtenus par adsorption sur alumine, d'une part, et par dialyse, d'autre part, ce qui nous a conduit à une papaine trois ou quatre fois plus active que la papaine initiale.

Comme l'action antibiotique et l'action enzymatique sont augmentées, d'une part, dans l'adsorbat sur alumine et, d'autre part, dans le dialysat, il est possible que la structure de l'antibiotique soit voisine de celle de l'enzyme cristallisé de BALLS.

*Voir page 59.

b) Par action des agents chimiques

Considérant la constitution de la chloromyoétine dans laquelle nous trouvons un groupement NO_2 et un atome de chlore, nous nous sommes demandé si l'introduction de différents substituants pouvait influencer l'action antibiotique.

Pour cela, nous avons traité le dialysat d'une solution de papaine 84 par du chlore, par de l'acide azotique et par du sulfate diméthylique.

Action du chlore :

Nous avons fait passer un long courant de chlore gazeux dans la solution placée dans de la glace. Après barbotage du gaz pendant 30 minutes, l'excès de chlore fut chassé par le vide et réchauffage à 37° sous la cloche.

Action de l'acide azotique :

5 ml d'acide azotique fumant, de densité $d = 1,52$, furent versés goutte à goutte dans une autre partie de la solution d'enzyme à 1 p.100 (50 ml) en milieu acidifié par 1 ml d'acide sulfurique refroidi à 0° .

Action du sulfate diméthylique :

2 g de sulfate diméthylique sont versés par un entonnoir à brome dans 25 ml de la solution d'enzyme à 10 p.100 placée dans de la glace. Après 6 heures, l'ensemble est retiré de la glace et laissé 48 heures sous vide sulfurique, pour éliminer l'ester méthylant en même temps que l'eau.

On obtient une poudre légèrement plus jaune que l'enzyme initial.

Les trois solutions furent réajustées à $\text{pH} = 7,0$ puis tyndallisées, enfin essayées au point de vue bactériostatique.

La bactériostase fut nulle; seul le pouvoir antiseptique fut accru par les opérations de chloration et de nitration ainsi qu'en témoignèrent les essais de repiquage de *S.aureus*, de *S.typhi*, du bacille d'Eberth qui ne poussèrent pas.

L'action de quelques agents chimiques susceptibles d'introduire des substituants de natures diverses, s'est donc révélée négative, dans les conditions expérimentales que nous avons suivies.

Ceci n'a rien de surprenant, puisque le chlore et l'acide nitrique sont des agents d'oxydation.

II

ESSAIS DE DESTRUCTION DU POUVOIR BACTERIOSTATIQUE

Avec la technique modifiée de HEATLEY, nous avons essayé l'activité bactériostatique de tous nos échantillons de papaine, notamment la papaine 71, les papaines de l'Institut Pasteur, vermiculée et de titre 100.

Aucun d'eux ne nous a donné le moindre halo de bactériostase, contrairement à la papaine 84 étudiée précédemment.

Nous avons cherché à quoi pouvait être attribuée la non activité de certaines papaines et nous avons essayé de détruire celle de notre échantillon actif, en particulier par le peroxyde d'hydrogène.

5 gr de papaine 84 délipidée à l'éther furent dissous à 37° dans l'eau distillée puis traités par 2 ml de peroxyde d'hydrogène à 30 p.100. On complète à 100 ml, puis reprécipite l'enzyme par l'alcool à 95°. Le précipité est centrifugé et afin d'éliminer toute trace d'antiseptique, on lave 3 à 4 fois le culot d'enzyme par l'alcool. On sèche le culot à l'étuve à 37°.

Nous avons ainsi traité deux prises d'essais différentes, dont nous avons recherché l'action bactériostatique comme suit :

- | | |
|---|------------|
| - Papaine traitée par H ₂ O ₂ dilution à 10 p.100 dans du bouillon de viande et tyndallisation: | 0,5 ml |
| - Tampon au citrate de sodium également tyndallisé | 4,5 |
| - Ensemencement par S.aureus Londres | |
| - Bleu de méthylène 1/5.000 | II gouttes |

La culture reprend en deux heures dans l'un des essais, à la 12me dans l'autre, alors que sans inactivation, la papaine maintient la bactériostase pendant 72 heures au moins.

L'oxydation paraît donc détruire le pouvoir bactériostatique de la papaine.

C'est pour cette raison que nos essais de délipidation par l'éther et l'acétone, ont privé nos préparations du principe antibiotique. Nous avons pensé initialement à la nécessité de l'intégrité du substrat protide + lipide; or, il n'en est rien, puisque si l'on délipide rapidement et avec de l'éther redistillé récemment sur chlore stanneux, donc privé de peroxyde, l'activité est conservée. Il est plus simple de délipider par les solvants anoxygénés type éther de pétrole, et entre 0° et +4°.

Essai de réactivation par réduction :

Sur tous les échantillons de papaine inactive, ainsi sur ceux inactivés par action du peroxyde d'hydrogène, nous avons fait agir un réducteur en vue de leur réactivation éventuelle.

La solution de papaine à 10 p.100 fut donc traitée par le monosulfure de sodium selon la formule :

Solution de papaine à 10 p.100	10 ml
Monosulfure de sodium $\text{SN}_2 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$	0,05g

Les deux échantillons inactivés par l'eau oxygénée et quatre échantillons non actifs furent testés à l'aide de deux souches de S.aureus, l'une locale, l'autre de Londres.

Aucune action bactériostatique n'a été constatée.

La destruction oxydative du principe bactériostatique de la papaine semble irréversible.

Chapitre V

COMPARAISON DE LA PAPAÏNE AVEC LA PEPsINE ET LA TRYPSINE COMME ANTIBIOTIQUES

Afin de rechercher le rôle éventuel de la pepsinase et de la trypsinase comme antibiotiques, des expériences parallèles à celles pratiquées avec la papaïne furent tentées avec des échantillons industriels de pepsine et de trypsine. Nous n'avons pu retrouver trace d'un pouvoir antibiotique quelconque dans ces enzymes. Vraisemblablement à cause de leur préparation effectuée sans précautions spéciales.

Des recherches ultérieures sur ces enzymes préparés dans le vide et conservés sous azote s'imposent.

Inversement, les antibiotiques classiques: pénicilline, streptomycine, chloromycétine, auréomycine, furent essayés en vue d'une recherche d'une activité protidolytique quelconque sur plusieurs substrat.

Cette recherche fut entièrement négative.

Il semble donc que l'activité antibiotique et protidolytique appartienne à la seule papaïne.

Chapitre VI

MECANISME POSSIBLE DE L' ACTION ANTIBIOTIQUE DE LA PAPAINE

I

ESSAI DE MESURE DE L' ACTIVITE DE LA PAPAINE SUR LA RESPIRATION DES GERMES

Dans un milieu exempt de substances azotées, ne contenant qu'un substrat minéral temponné aux phosphates à pH = 6,5 et comme seul composé nutritif le glucose, une souche de *S.aureus* pathogène futensemencée en atmosphère d'azote.

Dans les mêmes conditions de substrat, des essais furent conduits, après addition à la culture du tiers de son volume, d'une solution froide de papaine 84 à 10 p.100, ainsi qu'avec la papaine 100 et la papaine commerciale 71.

Dans tous les cas, la même quantité de microbes avait été introduite dans les différents substrats ainsi qu'il fut vérifié à la fin des essais, par pesée de l'extrait sec acétonique de la purée microbienne.

Des parties aliquotes de substrats avec et sans papaine, furent introduites dans les vases latéraux des tubes respirométriques de l'appareil de WARBURG. Après balayage de l'atmosphère par un léger courant d'azote, les vases furent immergés en même temps dans le thermostat à 37°C.

Après une heure d'agitation, les dénivellations manométriques furent lues. Les résultats furent identiques dans tous les essais, aux erreurs ordinaires près (5 à 10 mm de différence étant considérées comme insuffisants pour conclure).

La papaine n'a donc aucune action sur la respiration des germes vivants dans les cultures, puisque l'intensité respiratoire "quantité d'oxygène absorbée par heure et milligrammes de purée microbienne desséchée - unité GALE - " ne fut pas modifiée.

Nos résultats à l'appareil de WERBURG sont en opposition avec ceux de PRATT et DUFRESNOY (87) d'après lesquels l'antibiotique agirait principalement sur la consommation d'oxygène par les suspensions microbiennes.

GALE et TAYLOR (44) pensent que l'antibiotique inhibe l'assimilation de l'acide glutamique. Nous verrons bientôt, avec l'entérocoque comme test indicateur, que la papaine n'est pas insensible vis-à-vis de cet amino-acide, mais il n'est pas possible d'affirmer s'il s'agit, pour cet enzyme, d'une inhibition de l'assimilation.

KRAMPITZ et WERKMAN (60) ont constaté que la quantité d'oxygène consommée en présence d'acide ribonucléique est augmentée par rapport à l'émulsion microbienne témoin, et qu'elle est amoindrie par la présence de pénicilline.

Alors qu'ils ne mettent en cause que les seuls ribonucléotides pyrimidiques, MACHEBOEUF (70) rend aussi les ribonucléotides puriques responsables de cette action.

II

ESSAI DE MISE EN EVIDENCE DE DECARBOXYLASES PAPAINIQUES

En raison de nombreuses acquisitions sur les facteurs de croissance microbiens indispensables aux cultures, on pouvait se demander, *a priori*, si la papaine n'agissait pas par décarboxylation de certains amino-acides. Par là-même, en raison de la nature enzymatique de la papaine, pouvait se justifier son rôle comme bactériostatique.

Des solutions de différents amino-acides furent essayés au WARBURG, avec une solution de papaine à 1 p.100 dont 1 ml fut placé dans le diverticule latéral des fioles, tandis que 2 ml de solution également à 1 p. 100 des amino-acides suivants, dans l'eau bidistillée, furent placés dans la partie annulaire:

alanine	- acide glutamique
alanylglycine	- acide nicotinique
diglycylglycine	- aneurine
glutathion	

Tous les amino-acides étaient purs, de fabrication récente, provenant des laboratoires HOFFMANN-LAROCHE. Après 5 minutes d'équilibre thermostatique et barométrique, les lectures furent commencées de 5 en 5 minutes pendant une heure.

Au bout de ce temps, les dénivellations furent lues: elles étaient pratiquement nulle, par conséquent, le nombre de millimètres cubes de CO₂ dégagé par milligramme de carbone et par heure (unité de décarboxylase selon GALE) a été nul.

On en déduit donc que la papaine ne contient aucune décarboxylase susceptible de libérer CO₂ à partir des amino-acides étudiés.

III

ACTION DE LA PAPAINE SUR LES CULTURES D' ENTEROCOQUE EN PRESENCE D'ACIDE GLUTAMIQUE ET D'ANEURINE

A - Action de l'acide glutamique

L'acide glutamique a un rôle biochimique encore obscur puisqu'il interviendrait à la fois dans la synthèse de l'urée selon LEUTHARDT (65) et jouerait un rôle fondamental dans le métabolisme de la choline et des glucides selon BOULANGER (20) après avoir été "accusé" par POLONOVSKI (84) de trop se racémiser chez les cancéreux.

Le rôle de l'acide glutamique comme facteur de croissance indispensable fut signalé, dès 1946, par l'Ecole anglaise avec GALE (45). Une série d'expériences fut tentée avec l'entérocoque, germe sensible à cet amino-acide, d'abord, sur milieu synthétique, puis sur bouillon de viande ordinaire (milieu naturel) préalablement stérilisés à l'autoclave. Nous avons ensemencé avec une souche virulente d'entérocoque récemment isolée d'une coproculture et nous avons additionné le milieu de bleu de méthylène à 1/10.000.

Après 24 heures d'étuvage à 37°, nous avons obtenu les résultats figurant au tableau ci-dessous :

Tableau montrant l'action de l'acide glutamique :

...../

Tableau montrant l'action de l'acide glutamique :

Avec milieu synthétique :

1	2	3	4
Milieu synth.s. 2ml	Mil.synth.s. 2ml	Mil.synth.s. 2ml	Mil.synth.s. 2ml
Sol.glucose à 30 p.100 0,025	Sol.glucose 0,025	Sol.glucose 0,025	Sol.glucose 0,025"
	Papaïne 1 p.100 0,5		Papaïne 1 p.100 0,5
Eau distillée 1 ml	Eau distillée 0,5	Eau distillée 0,5	
		Ac.glutamique 1 p.100 0,5	Ac.glutamique 1 p.100 0,5
Entérocoque (culture) II gtes	Entérocoque II gttes	Entérocoque II gttes	Entérocoque II gttes
Croissance +++	Croissance 0	Croissance +++++	Croissance 0

Avec milieu naturel :

1	2
Milieu naturel 2 ml	Milieu naturel 2 ml
Eau distillée 1 ml	Papaïne 1 p.100 1 ml
Entérocoque II gttes	Entérocoque II gttes
Croissance +++++	Croissance 0

Ces résultats permettent d'énoncer les propositions suivantes :

- 1°) L'acide glutamique semble être un facteur de croissance pour l'entérocoque;
- 2°) La papaïne semble bloquer l'acide glutamique ou un système enzymatique où intervient l'acide glutamique vis-à-vis de l'entérocoque;
- 3°) Le milieu naturel, ou contient de l'acide glutamique, ou permet au germe la synthèse de cet acide favorisant la croissance.

B - Action de l'aneurine seule
et de l'aneurine additionnée d'acide glutamique

En raison du rôle possible de l'aneurine, les mêmes expériences furent reprises après addition de 0,5 ml d'une solution d'aneurine à 1 mg par ml, soit 500 μ g. par essai; les tubes furent portés 24 heures à 37°.

Le dosage de l'aneurine fut pratiqué par la méthode classique d'oxydation en thiochrome par le ferriocyanure de potassium en milieu alcalin et extraction du chromogène à l'isobutanol.

Tableau montrant l'action de l'aneurine :

Mil.synth.S	2 ml	Mil.synth.S	2 ml	Mil.synth.S	2 ml	Mil.synt.S	2 ml
Sol.glucose à 30 p.100 0,025"		Sol.glucose à 30 p.100 0,025"		Sol.glucose 0,025		Sol.glucose 0,025	
		Papaine à 1 p.100 0,5				Papaine	0,5
Eau distillée	1 ml	Eau distillée	0,5	Eau distillée	0,5		
				Aneurine	500 µg	Aneurine	500 µg
Entérocoque II gtes		Entérocoque II g.		Entérocoque II g.		Entérocoque II g.	
Croissance	+++	Croissance	0	Croissance	++++	Croissance	0

Tableau montrant l'action de l'aneurine et de l'acide glutamique :

Mil.synth.S	2 ml	Mil.synth.S	2 ml	Milieu n	2 ml	Milieu n	2 ml
Sol.glucose 0,025"		Sol.glucose 0,025		Sol.glucose 0,025		Sol.glucose 0,025	
Aneurine	500 µgr	Aneurine	500 µgr	Aneurine	500 µgr	Aneurine	500 µgr
Ac.glutamique à 1 p.100 0,5ml		Ac.glutamique 0,5ml		Ac.glutamique 0,5ml		Ac.glutamique 0,5ml	
		Papaine à 1 p.100 0,5ml				Papaine à 1 p.100 0,5ml	
Entérocoque II gtes		Entérocoque II g.		Entérocoque II g.		Entérocoque II g.	
Croissance	++++	Croissance	0	Croissance	++++	Croissance	0

Cette série d'essais permet de conclure ce qui suit :

- 1°) L'aneurine est un facteur de croissance pour l'entérocoque;
- 2°) L'aneurine n'intervient pas avec l'acide glutamique pour favoriser la croissance du germe;
- 3°) Ce n'est pas l'aneurine qui est bloquée par la papaine dans le système où l'acide glutamique est bloqué,

RESUME DES CHAPITRES I à VI

Après une description des méthodes d'études suivies, on arrive aux conclusions suivantes :

- 1°) La papaïne 84 est douée d'un pouvoir antibiotique net sur un certain nombre de germes, principalement aérobies, surtout les staphylocoques et les streptocoques.
- 2°) L'adsorption sur l'alumine et la dialyse permet une concentration de 3 à 4 fois du pouvoir antibiotique.
- 3°) Le pouvoir antibiotique disparaît avec le temps, du fait des agents d'oxydation; cette destruction est irréversible et explique l'inexistence du pouvoir antibiotique des papaïnes industrielles préparées sans précautions particulières.
- 4°) L'action du chlore, de l'acide nitrique, du sulfate diméthylque, fait disparaître l'action antibiotique.
- 5°) Les enzymes protidolytiques industriels, pepsine et trypsine, n'ont pas montré d'activité antibiotique.

Inversement, les principaux antibiotiques connus n'ont donné aucune activité protidolytique.

- 6°) En essayant d'expliquer le mécanisme possible de l'action antibiotique de la papaïne, on démontre :
 - a) Avec *S.aureus* que la respiration des microbes n'est pas modifiée par l'antibiotique;
 - b) Que la papaïne ne semble pas douée d'une action décarboxylasique;
 - c) Avec l'entérocoque comme germe d'essai, que la papaïne semble bloquer ou inhiber un système où intervient l'acide glutamique et où l'aneurine n'intervient pas.

Chapitre VII

LA PAPAINE, FACTEUR DE CROISSANCE DES ANAEROBIES ROLE DES SUBSTANCES REDUCTRICES

C'est en 1946 que nous avons constaté l'abaissement du niveau des potentiels d'oxydo-réduction des hydrolysats papainiques ajoutés à différentes cultures microbiennes. En même temps, nous avons alors essayé l'addition des antibiotiques connus, la pénicilline et la streptomycine, sur des milieux de cultures microbiennes en présence de différents colorants indicateurs d'oxydo-réduction.

Tous ces milieux étaient tamponnés à pH = 7, de telle sorte que les red-ox potentiels correspondaient à l'échelle biologique étalée de -427 mV à +810 mV.

Nous avons utilisé les colorants suivants :

Thionine	+ 63 mV	Vert Janus	-258 mV
Bleu de méthylène	+ 11 mV	Safranine	-289 mV
Bleu de Nil	-142 mV	Rouge neutre	-430 mV

Ils furent ajoutés à des substrats à 1 p.100 de gélatine et à 1 p.100 de fibrine dans les proportions :

I	{	Substrat à 1 p.100	10 ml
		Tampon phosphates à pH=7	4 ml
		Sol.de papaine à 1 p.100	5 ml
		Indicateur à 1 p. 5000	V gttes

Des témoins furent préparés pour chaque colorant avec de la papaine sans substrat (II) et du substrat sans papaine (III)

II	{	Eau distillée	10ml	III	{	Substrat	10ml
		Tampon phosphates à pH=7	4ml			Tampon à pH = 7	4ml
		Sol.papaine à 1 p.100	5ml			Eau distillée	5ml
		Indicateur à 1 p.5000	V gttes			Indicateur à 1 p.5000	Vgttes

Tous les tubes furent portés au thermostat à 56° pendant 12 heures. Au bout de ce temps, les lectures furent appréciées comme indiqué dans le tableau ci-dessous; les résultats étaient les mêmes pour les deux substrats gélatine et fibrine :

1°) Thionine	$\left\{ \begin{array}{l} \text{I} \text{ décolorée} \\ \text{II} \text{ décolorée} \\ \text{III} \text{ intacte, violet intense} \end{array} \right.$
2°) Bleu de méthylène	$\left\{ \begin{array}{l} \text{I} \text{ décoloré} \\ \text{II} \text{ décoloré} \\ \text{III} \text{ intact, bleu intense} \end{array} \right.$
3°) Bleu de Nil	$\left\{ \begin{array}{l} \text{I} \text{ entièrement décoloré} \\ \text{II} \text{ partiellement décoloré} \\ \text{III} \text{ intact, bleu clair intense} \end{array} \right.$
4°) Vert de Janus	$\left\{ \begin{array}{l} \text{I} \text{ rose pâle, adsorbat rose} \\ \text{II} \text{ rose pâle, adsorbat bleu vert} \\ \text{III} \text{ intact, bleu-vert} \end{array} \right.$
5°) Safranine	$\left\{ \begin{array}{l} \text{I} \text{ intact} \\ \text{II} \text{ intact} \\ \text{III} \text{ intact} \end{array} \right.$
6°) Rouge neutre	$\left\{ \begin{array}{l} \text{I} \text{ intact} \\ \text{II} \text{ intact} \\ \text{III} \text{ intact} \end{array} \right.$

La papaïne abaisse donc le potentiel d'oxydo-réduction des hydrolysats aux environ de -250mV, ce qui permet de classer un substrat constitué par les hydrolysats papaïniques à la limite admise par WURMSER (116) et par PREVOT (88) séparant les aérobies facultatifs des aérobies stricts.

Il devenait intéressant de suivre les variations par colorimétrie des potentiels d'oxydo-réduction en présence de cultures microbiennes. On sait en effet, depuis 1936, avec HEWITT (51), que la plupart des courbes de croissance des aérobies commencent, selon les microbes, autour de +300mV et que la phase de latence s'accompagne d'un abaissement considérable du potentiel d'oxydo-réduction.

Dans les cultures de S.Aureus, il passe de +325mV à -70mV dans les deux premières heures, sur le streptocoque, il passe de +330 à +150mV pour Escherischia Coli, il passe de +400 à -300mV.



Les expériences conduites avec *S. aureus*, l'entérocoque, *E. coli*, ont permis de constater que le potentiel était abaissé plus rapidement qu'en l'absence de papaine (sur substrat de bouillon de viande préparé avec et sans hydrolyse papainique) et qu'il demeurait faible pendant des temps variant de 48 à 96 heures, suivant à peu près les résultats de la bactériostase observés et que nous mentionnons au chapitre III de cette deuxième partie.

Une expérience inverse de la précédente fut aussitôt tentée avec un anaérobie strict. Avec *Clostridium histolyticum*, qui pousse sur des substrats plus réducteurs vis-à-vis des colorants, la croissance ne fut pas entravée, mais au contraire, fut accélérée par la présence de la solution de papaine. Ce fut cette première expérience qui nous incita à utiliser un hydrolysate papainé pour la culture des anaérobies.

L'expérimentation fut reprise sous huile de paraffine d'abord, en atmosphère d'azote ensuite; elle conduisit aux mêmes résultats.

L'interprétation des courbes obtenues avec les anaérobies apparaît assez simple; le micro-organisme se trouve d'abord en présence d'un excès de substances réductrices qu'il doit métaboliser peu à peu jusqu'à l'obtention de molécules moins bactériostatiques pour sa croissance.

Nos mesures effectuées sur des cultures par les indicateurs d'oxydo-réduction étaient terminées quand, en 1947 et en 1948, DUFRESNOY et PRATT (32) publièrent leurs résultats sur les cultures de *S. aureus* soumis à l'action de la streptomycine.

La streptomycine, pour ces auteurs, agit surtout sur *S. aureus* anaérobies en maintenant un potentiel relativement élevé à +200mV quand

l'antibiotique est ajouté précocement. Si l'addition de l'antibiotique est plus tardive, le potentiel est de +100mV, tandis que le témoin reste à -100mV.

En atmosphère d'azote, le résultat n'est pas superposable, mais le potentiel reste supérieur à +150mV à celui du témoin.

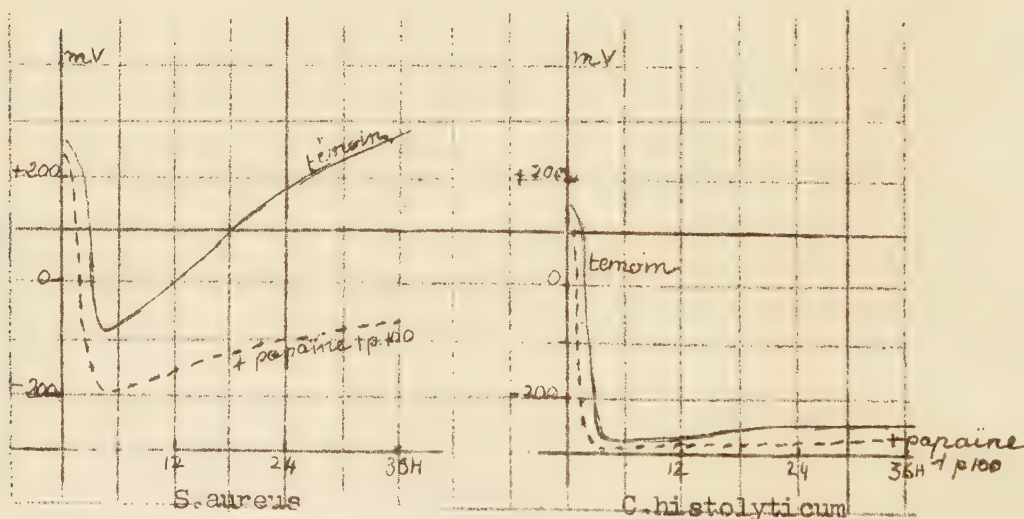
Cependant, les auteurs reconnaissent avoir été gênés par la présence de substances réductrices qui inhibent la streptomycine ainsi que par l'acidité progressive du milieu, qui passe de pH = 7 à pH = 6,2.

Malgré cela, ils ne corrigent pas les potentiels qu'ils ont trouvés.

Plus nets sont les résultats de DROUHET et KEPES (31) qui, en 1949, ont mesuré des potentiels de culture de *S.aureus* après addition de pénicilline. Celle-ci, ajoutée à des cultures de staphylocoques à des doses infra-léthales, ralentit fortement l'abaissement du potentiel d'oxydo-réduction qui accompagne normalement l'évolution de la phase de croissance logarithmique.

L'arrêt de la chute et l'ascension du potentiel au niveau initial sont d'autant plus rapides que la concentration de la pénicilline ajoutée est plus grande et que le moment auquel on l'ajoute est plus précoce.

Nos courbes, obtenues avec les indicateurs d'oxydo-réduction différent de celles de DUFRESNOY et PRATT et de celles de DROUHET et KEPES par les niveaux de potentiels qui restent bas aussi bien avec *S.aureus* où la papaine agit comme antibiotique, qu'avec *C.histoliticum* où elle agit comme facteur de croissance.



par colorimétrie

Chapitre VIII

ESSAIS DE CARACTERISATION DES REDUCTEURS

Le problème de la présence d'un réducteur important dans les hydrolysats papainiques fut abordé par deux voies opposées: analyse des bouillons et addition de substances réductrices diverses à des bouillons non traités par l'enzyme. C'est la seconde voie qui nous rapprocha d'abord du but.

I

CARACTERISATION DIRECTE

La croissance des microbes classés comme anaérobies dans des hydrolysats papainiques, nous invita à rechercher quelles pouvaient être les substances réductrices plus directement responsables de ce fait.

Nous avons cherché à caractériser le glutathion, la cystine et la cystéine, la thréonine, l'acide ascorbique, enfin, l'acide succinique dans des hydrolysats concentrés de foies de veaux frais soumis à l'action de 2 à 3 p.100 de papaine 84 à l'étuve à 56°C pendant 24 heures puis filtration et trois tyndallisations à 75°C.

1°) Glutathion :

Comme dans la première partie, le glutathion fut recherché et dosé par la technique de BINET et WELLER (17) après précipitation par le lactate de cadmium. Une moyenne fut établie avec la méthode au nitroprussiate de sodium.

Dans les hydrolysats frais, nous avons trouvé 400 à 600 mg de

glutathion par litre de bouillon ou, plus exactement, de substances dosées comme telles.

2°) Cystine et cystéine :

L'ensemble fut dosé par la réaction de SULLIVAN, HESS et HOWARD (101) au naphthopyrnone 1-2 sulfonate de sodium 4 après utilisation des deux réducteurs amalgame de sodium et cyanure de sodium. On trouve, par litre d'hydrolysats, de 50 à 100 mg de cystine et cystéine.

3°) Acide ascorbique :

La présence de l'acide ascorbique fut éliminée en raison du maintien de la coloration bleue du dichlorophénol indophénol 2-6, puis du rouge par addition d'acide acétique jusqu'à pH = 4.

D'ailleurs, il était à prévoir que si l'acide ascorbique pouvait être présent dans le bouillon, ce dernier devait présenter dans les 48 heures une baisse considérable de son activité favorable vis-à-vis de la culture des anaérobies, du fait de la rapide disparition de la vitamine: or, l'activité est maintenue pendant plus de 8 jours.

4°) Thréonine :

Nous avons recherché la thréonine acide α amino-β hydroxy-butyrrique par la méthode de GUILLEMET et PEYNAUD (50) consistant à oxyder la thréonine en tampon phosphate monopotassique + PO_4H_3 à pH = 3,5 environ, par MnO_4K , 0,005N, à distiller sous pression réduite, et à recueillir l'éthanal dans un excès de bisulfite, puis titrage iodométrique final.

Nous n'avons pas réussi à titrer la thréonine dans un milieu aussi complexe qu'un hydrolysats papainique.

5°) Acide succinique :

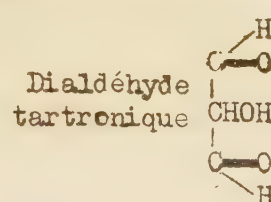
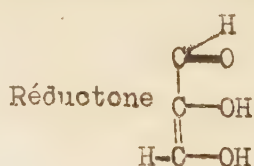
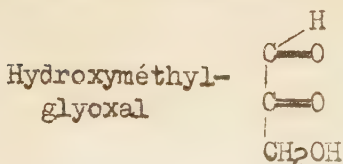
Nous consacrerons un paragraphe spécial à l'acide succinique qui a fait l'objet de nos recherches personnelles.

II

ADDITION DE REDUCTEURS AUX MILIEUX DE CULTURES POUR ANAEROBIES

1°) Rôle de l'hydroxyméthylglyoxal :

On sait depuis longtemps que l'addition de la "réductone" d'EULER et MARTIUS, forme enolique du dialdéhyde tartronique et de l'hydroxyméthylglyoxal de WURMSER (117) permet la culture des anaérobies.



La réductone pure est assez difficile à trouver et les produits industriels qui en contiennent comme la "réductose" de PREVOT, sont livrés sans que soit connue la teneur en composé pur qui, seul, intéresse le biologiste.

2°) Rôle des dérivés "thiolés" :

Pendant longtemps, notre effort s'est porté sur l'addition de groupements "thiolés" autres que le glutathion ou la cystéine.

Nous avons préparé, notamment, du thioacétate de sodium, mais outre que la manipulation des thiocétates est fort désagréable, l'obtention de sels cristallisés à partir de l'acide thioacétique est loin d'être aisée.

3°) Rôle de succinate de sodium:

A la suite de ces recherches, nous eumes l'idée d'ajouter dans les bouillons pour les cultures d'anaérobies (5) un réducteur puissant et stable, facilement stérilisable dans les conditions habituelles de préparation des milieux de culture, le succinate de sodium. Nous l'avons obtenu cristallisé en saturant l'acide succinique pur de MERCK par du carbonate de sodium R.P.

Deux séries d'essais furent pratiquées: l'une avec un hydrolysât de viande et de foie par la papaine en présence de 0,5 g par litre de succinate de sodium, l'autre avec du bouillon ordinaire additionné de 1 p.100 de glucose et 0,5 g p.1000 de succinate.

a) Dans la première série nous avons mis en oeuvre un hydrolysât papainique de composition :

viande de boeuf	500 g
foie de veau	550 g
papaine	5 g
eau	2000 g

qu'on laisse digérer 6 heures à 56°.

Après filtration, précipitation et ajustage à pH = 7,35, on ajoute 1 g de succinate, on distribue en tubes, stérilise 10 minutes à 115°, refroidit et ensemence.

On porte alors à l'étuve à 37°. Il est possible de cultiver ainsi les anaérobies suivants : *Clostridium ovyi*, *Cl. perfringens*, *Cl. sporogènes*, *Cl. septicum*, *Plectridium tetani*. On note une production de SH_2 et une modification du pH du milieu.

Une souche de *P. tetani*, vieille de 25 ans, conservée en tube scellé, a poussé en 5 heures dans ces conditions.

BRISOU (22), à la suite de ces premiers résultats, étudia l'isolement rapide des anaérobies à l'air libre, à l'aide de ce milieu, pour des souches plus difficiles comme *Welchia perfringens*, *Cl. oedematiens* (Var. *novyi*), *Spherophorus ridiculosus*, *Spherophorus necrophorus*, *Streptococcus putridus*, *Fusiformis polymorphus*.

b) Dans la seconde série nous avons simplement ajouté à du bouillon de viande ordinaire sans papaine, 1 p.100 de glucose et 0,5 p.1000 de succinate de sodium.

Ce milieu a permis la culture des anaérobies *Plectidrium tetani* et *Clostridium perfringens*. Les cultures sont toutefois beaucoup moins riches et se développent plus lentement qu'avec l'hydrolysât précédent.

4°) Rôle du fumarate de sodium:

Nos notions sur les transporteurs d'hydrogène et les chaînes déhydrasiques sont suffisamment exposées dans les traités classiques de biochimie qui mentionnent les "repas d'hydrogène" et la "même monnaie énergétique". Il nous a paru logique d'essayer l'addition de fumarate de sodium à nos milieux de culture.

Du bouillon de viande ordinaire, non papainé, glucosé à 1 p.100, fut additionné de 0,500 g p.1000 de fumarate de sodium. Après stérilisation 10 minutes à 115°, le bouillon fut ensemencé comme précédemment, notamment avec des clostridium.

Comme prévu, aucune culture de clostridia ne put apparaître. Le germe anaérobie a besoin de l'hydrogène libéré par les chaînes de déhydrases; s'il se trouve un accepteur sensiblement de même niveau de potentiel que le système déhydrasique, le germe ne peut plus pousser.

Cette explication nous paraît la seule possible, puisque le fumarate, par ailleurs, n'est ni bactériostatique, ni antiseptique.

III

RECHERCHE DIRECTE DE L'ACIDE SUCCINIQUE ET DE L'ACIDE FUMARIQUE DANS LES HYDROLYSATS PAPAINIQUES

Les résultats précédents, notamment ceux de la première série d'essais, nous ont conduit à rechercher la présence d'acide succinique dans les hydrolysats papainiques. La méthode chimique employée dosant à la fois les acides succinique et fumarique, nous sommes obligé de les citer ensemble. Il ne nous a pas été possible, en effet, de caractériser séparément les deux diacides.

Pour l'extraction, nous avons appliqué la technique de PEYNAUD (82), basée sur la résistance de l'acide succinique à l'oxydation permanganique et son extraction par l'éther. PEYNAUD ajoute un excès de sel d'argent qui précipite le succinate argentique et termine par un titrage par le sulfocyanure, selon CHARPENTIER-VOIHARD.

Cette méthode, en principe excellente, mais d'ailleurs non spécifique, s'avère délicate pour tous les hydrolysats riches en matières organiques et, par conséquent, pour les hydrolysats papainiques.

Elle est très longue et exige une grande quantité de permanganate pour obtenir une oxydation convenable. Celle-ci, d'ailleurs, dans le problème qui nous intéresse, n'est peut-être pas à recommander, car rien ne prouve qu'elle ne soit pas aussi capable, tout en respectant bien entendu l'acide succinique préexistant, de provoquer, par suite de dégradations connues, la production d'acide succinique aux dépens des glucides, des lipides et des protides. Le problème, pour l'acide succinique, est donc au moins autant d'ordre qualitatif que quantitatif.

Pour toutes ces raisons, les techniques de dosage de l'acide succinique, depuis l'ancienne méthode de GLUTTERBUCK (29), jusqu'à celle de PEYNAUD, furent remplacées par une méthode colorimétrique "relativement" plus spécifique basée sur l'utilisation de la réaction de ROSENTHALER (96).

Voici comment nous avons opéré pour extraire l'acide succinique des hydrolysats papainiques:

"Après ajustage à $\text{pH} = 1$, à l'électromètre, au moyen de SO_4H_2 , 2N, les lipides sont épuisés pendant 12 heures à l'appareil de HANSEN par de l'éther rectifié sur chlorure stanneux.

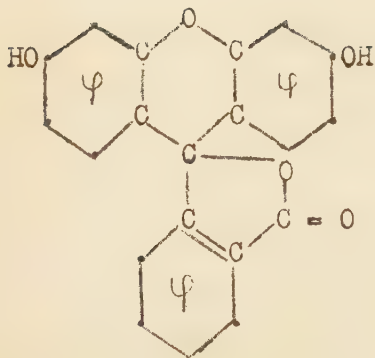
"L'éther évaporé contient des lipides et l'acide succinique. On reprend par l'eau à l'ébullition, acidifie à nouveau, laisse refroidir et épuise à nouveau par l'éther. On recommence plusieurs fois cette opération pour obtenir des cristaux incolores. Ceux-ci ont un point de fusion d'environ 180° .

"Ces cristaux se prêtent à la réaction de ROSENTHALER que nous avons nous-même modifiée pour pratiquer un dosage (7).

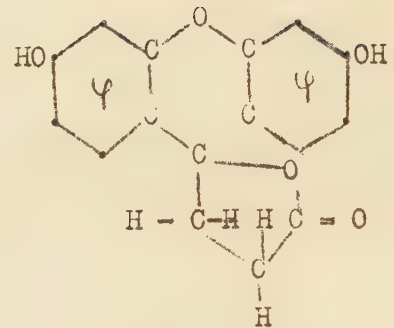
"Elle consiste à chauffer au bain d'huile, à 160° , pendant 10 minutes, 1 ml d'acide sulfurique concentré et incolore, de densité $d = 1,66$ avec 10 mg de résorcinol R.P. et 10 ml de cristaux d'acide succinique. Après refroidissement, on ajoute 12 ml d'ammoniaque concentrée pure R.P. Il apparaît une teinte verte phosphorescente par réflexion plus ou moins rosée par réfraction.

"L'acide oxalique, l'acide malonique, l'acide tartrique, l'acide lactique, l'acide glutamique, l'acide aspartique ne donnent pas la coloration de ROSENTHALER ou conduisent à une teinte vaguement fluorescente. Seuls l'acide succinique et l'acide fumarique donnent une très belle coloration. Nous avons montré qu'en graduant les concentrations d'acide succinique de 1 à 20 mg on peut facilement pratiquer une comparaison colorimétrique ou, mieux, une mesure de fluorescence au moyen d'un électrophotomètre possédant le dispositif spécial pour de telles mesures. Entre 5 et 15 mg la proportionnalité est convenable; pour l'analyse qualitative, on peut caractériser 0,1 à 0,2 mg d'acide succinique par fluorométrie".

La réaction sulforésorcinolique de ROSENTHALER s'apparente aux réactions phthaléiniques, il suffit de comparer le cycle lactonique de l'anhydride phthalique à la chaîne en C_4 de l'anhydride succinique qui prend naissance dans les conditions de la réaction, pour comprendre la formation d'un colorant avec le résorcinol, le résorcinol-succéine.



Résorcinol-phthaléine



Résorcinol-succéine

D'après cette technique, on trouve de 10 à 250 mg par litre de substances donnant la réaction sulfo-résorcinolique dans les hydrolysats papainiques.

Chapitre IX

ROLE COLLAGENASIQUE DE LA PAPAINE

Les collagénases sont des enzymes actifs en milieu fortement réducteur. Or, en considérant les premières courbes obtenues avec nos colorants red-ox, BRISOU et MILHADE ont eu l'idée d'étudier comparativement l'action de certains enzymes microbiens sécrétés par des anaérobies et l'action de la papaine sur des collagènes (23).

Pour DELAUNAY (30), les principaux anaérobies susceptibles de sécréter des collagénases sont *Welchia perfringens*, *C.histoliticum*, *C.bif fermentans*. D'autres auteurs, dont MAC FARLAN et MAC LENNAN (71) avaient déjà trouvé que *B.brevis*, *B.mycoides*, *B.mesentericus*, *C.sporogenes*, *C.lentoputrescens* se comportent identiquement. BRISOU et MILHADE montrèrent que le problème était très complexe du fait de la difficile qualification du substrat: il y a en effet, des collagènes et non pas un collagène, la scléroprotéide différant d'un auteur à un autre autant par l'origine histologique des matériaux de départ que par les procédés d'extraction et d'étude préconisés.

BRISOU prépare un collagène à partir de tendons des pattes postérieures de veau et de peau du dos de jeune boeuf, ce qui est aussi aisé que de préparer le collagène à partir de queues de rats adultes. Soumis à un décreusage alternatif à ClH à 1 p.100 à froid, puis à HONa à 2 p.100 également mis à froid, puis à l'hydrolyse tryptique 48 heures à 45°, enfin à un rinçage et un traitement répété à l'acétone, le protéide insoluble constitue le collagène de bovidé donnant au kjeldahl de 11,8 à 12,7 p.100 d'azote total, soit en appliquant le coefficient empirique moyen 6,3 de 74 à 79,8 p.100 de protéines. Ce substrat particulièrement riche en azote et passant pour difficilement hydrolysable en raison sans doute de sa structure de haut polymère, a été soumis, d'une part, à l'action des anaérobies ci-dessus mentionnés et, d'autre part, à l'action de la papaine à pH = 3, de la trypsine à pH = 8, de la papaine à pH = 7, à 45°. Dans ces conditions, *Cl.histoliticum* et la papaine furent les seuls à digérer les fragments de collagène, la papaine 84, notamment, les

dissolvait complètement en quelques heures. La peau contenant dans son tissu conjonctif de 0,7 à 31 p.100 de collagène, nous avons peut-être là l'explication du pouvoir lytique important constaté par action de la papaine sur les tissus mortifiés.

Au point de vue théorique, le parallélisme entre l'action de Cl. histolyticum et celle de la papaine est frappant et l'enzyme du latex apparaît bien comme enzyme d'autant plus actif, que le substrat est un substrat pour anaérobie. Ce substrat réducteur voit ce caractère renforcé par les activateurs réducteurs classiques du latex du papayer, cyanures, acide sulfhydrique, dérivés thiolés.

Chapitre X

CONCEPTIONS NOUVELLES SUR L' ANAEROBIOSE DISSOCIATION DES RESULTATS COLORIMETRIQUES ET ELECTROMETRIQUES

Il convenait, pour renforcer nos affirmations expliquant le rôle favorable des hydrolysats papainiques pour les anaérobies et l'action collagénasique de la papaine, de reprendre nos expériences de potentiels aux indicateurs red-ox avec des lectures potentiométriques. La quasi totalité des publications sur les red-ox potentiels précisent en effet que les lectures colorimétriques ont été confirmées par électrométrie, avec électrode à hydrogène, électrode d'antimoine, électrode à quinhydrone principalement. Enfin, depuis quelques années, c'est surtout le potentiel du platine poli, immergé dans le milieu en expérience, où plonge en même temps une électrode de calomel qui est surtout utilisé. C'est cette dernière méthode que nous avons retenue avec un appareil potentiométrique de CARPENTIER ou celui de QUERE. Nous jugeons indispensable de préciser quelques remarques préliminaires :

1°) Nous spécifions bien qu'il s'agit de potentiel de platine poli, monté en opposition avec une électrode de calomel, elle-même tarée par rapport à une électrode normale à hydrogène. Dans ces conditions, le niveau de l'électrode de calomel, pôle +, est de +250mV, à 22°, par rapport au platine poli, pôle -.

2°) Dans les milieux faiblement tamponnés, riches en électrolytes, pauvres en protéines et amino-acides, la lecture du potentiel en fonction du pH, peut être faite correctement en appliquant la relation, pour les électrolytes faibles:

$$E^{\text{volt}} = E_0 - 0,06 \text{ pH pour les acides}$$

$$E^{\text{volt}} = E_0 - 0,03 \text{ pH pour les bases}$$

ou en r H₂

$$R H_2 = 33,3 E + 2 \text{ pH}$$

Pratiquement, on utilise les courbes de CLARK et WURMSER (28) qui permettent des corrections de l'ordre de +40 à +60mV par unité pH quand l'acidité augmente.

3°) Par contre, dans les milieux fortement tamponnés, comme le sont nos hydrolysats papainiques, il est indispensable de mesurer le potentiel dans un substrat préalablement tamponné à pH = 7, car les corrections classiques ne sont plus applicables. Ceci était prévisible puisqu'il faut une bien plus grande quantité d'alcali pour ramener un bouillon acide à pH = 7, qu'il n'en faudrait pour ramener une solution d'électrolytes en partant toutefois du même pH.

Voici des mesures qui confirment cette assertion:

1re expérience : Milieu acide succinique - acide fumarique.

pH = 6,0 - Red-ox potentiel à 37°C + 85mV

Le même milieu neutralisé exactement par mesure directe à l'électrode de verre plongeant dans le vase où l'électrode de platine est opposée à l'électrode de calomel.

pH = 7,0 - Red-ox potentiel à 37°C + 30mV

2me expérience : Hydrolysate viande-foie papainique à 2 p.1000 d'enzyme.

pH = 6,0 - Red-ox potentiel à 37°C + 350mV

Après neutralisation:

pH = 7,0 - Red-ox potentiel à 37°C = 180mV

Dans le premier cas, l'erreur de potentiel est de +55mV si l'on ne corrige pas le pH.

Dans le deuxième cas, l'erreur est de +170mV si l'on ne corrige pas le pH.

Cette remarque, très importante, est signalée sous une autre forme par ENSELME (40) qui écrit: "En fait, dans la pratique biologique, un grand nombre de facteurs sont capables de troubler les prévisions des red-ox potentiels".

CARPENI (24) réserve surtout l'indication rH_2 pour les systèmes "incomplètement ou imparfaitement définis". Lorsque l'on désire simplement connaître le potentiel oxydo-réducteur, d'une solution complexe "on pourra l'exprimer sous la forme du rH_2 , en indiquant, si nécessaire, aussi le pH. Il en sera de même dans les cas biologiquement importants où le pH ne varie pas ou varie fort peu, du moins dans un certain domaine. Dans ces conditions, le rH_2 définit le système d'une façon suffisante".

Mais pourquoi laisser le rH_2 aux biochimistes et réserver la notation de potentiel aux chimistes, puisque le rH_2 dépend du potentiel et que ce potentiel varie considérablement selon les variations du pH du milieu biochimique ?

A notre avis, la variation due au pH est si importante que tout potentiel doit être mesuré dans des conditions de pH toujours identiques. Dans les hydrolysats, dans les milieux de culture, s'il n'y a pas de tampons suffisants, il faut ou bien ramener au pH initial avant la lecture du potentiel, ou bien faire deux essais dont l'un est ramené au pH initial pour la lecture réelle du potentiel et la correction obtenue doit être retenue, additive ou soustractive pour le second essai.

4°) L'allure des courbes de potentiels en fonction du pH ne semble pas avoir attiré l'attention de certains auteurs.

P.THOMAS (105) cite un $rH_2 = 20$ en milieu anaérobie, tandis qu'en présence de l'oxygène rH_2 varie de 11 à 12, ce qui est l'inverse de ce qui doit se produire selon la notation rH_2 allant de 0 pour l'hydrogène pur à 42 pour l'oxygène pur.

REISS (91), sur la papaine, aurait aussi trouvé des résultats qui semblent inexplicables d'après l'étude des courbes classiques. Selon lui, dans le latex naturel du papayer, l'enzyme serait activé par des réducteurs comme le système glutaminyl-cystéine, et par le glutathion réduit, ce qui est exact, mais le red-ox potentiel optimum serait de -400mv à pH = 4,8, tandis qu'il serait de -300mV à pH = 6,3 alors que les courbes indiquent une baisse de potentiel, quand on passe de pH = 4,8 à pH = 6,3.

Il est inutile de citer de nombreuses références où les résultats de potentiels sont contradictoires et en opposition avec les données expérimentales les plus immédiates.

COMPARAISON ENTRE LES RESULTATS COLORIMETRIQUES ET LES RESULTATS ELECTROMETRIQUES

Les mesures électrométriques des potentiels d'oxydo-réduction de nos milieux de culture ont été effectuées, depuis nos publications, avec BRISOU, concernant les milieux de cultures pour anaérobies à partir de bouillon de viande et de foie hydrolysés par la papaine et enrichis en acide succinique.

D'après nos recherches antérieures utilisant les indicateurs d'oxydo-réduction d'une part et les résultats acquis sur la bactériostase des aérobies et la croissance des anaérobies d'autre part, nous escomptions trouver des potentiels électrométriques concordant aux environs de -200mV à -300mV.

Les premiers résultats vinrent infirmer totalement ces pronostics et ce furent des potentiels de l'ordre de +250mV que nous donna l'électrode de platine opposée à l'électrode au calomel.

Pour éliminer la possibilité d'une erreur de technique ou un défaut d'isolement de l'électrode de platine qui aurait pu être mal soudée au verre et au conducteur blindé de cuivre, reliant le fil de métal inattaquable à la borne du potentiomètre, nous avons reproduit nos essais avec d'autres appareils. Les même résultats ont été obtenus et, partant, le doute ne peut subsister.

Nos milieux, notamment le V.F.S. permettent la culture d'anaérobies strictes comme les clostridium, alors que son rH_2 potentiométrique est de 20 au lieu de 3 à 2 comme il est généralement admis.

WURMSER et GELOSO, PLOTZ et GELOSO, AUBEL et ses collaborateurs cités dans le traité de DUMAS et les chefs de services de l'Institut Pasteur (33) signalent que, "quel que soit le rH_2 initial d'un bouillon de culture, le rH_2 final est uniformément voisin de 5,5, même si, dans les premières heures de la culture, il est descendu très bas, à 3 et même 2,5".

PREVOT et REINERT (89) opérant sur 100 souches et avec les indicateurs:

Phénosafranine	- rH_2 = 5,8	ou - 350mV environ
Rouge neutre	- rH_2 = 3,1	ou - 375mV
Safranine	- rH_2 = 2,5	ou - 400mV

Donnent même une classification des anaérobies d'après leur aptitude à réduire plus ou moins les colorants ci-dessus :

- 1°) Anaérobies réduisant définitivement la safranine $rH_2 < 2,5$
groupe comprenant *W.perfringens* - *Cl.oedematiens* - *Cl.bifermentens* - *Cl.butyricum* - *Cl.hemolyticum* - *Cl.botulinum A*.
- 2°) Anaérobies réduisant définitivement le rouge neutre et temporairement la safranine $3,1 > rH_2 > 2,5$
Cl.botulinum B - *Cl.sporogenes* - *Cl.septicum* - *Cl.histolyticum*.
- 3°) Anaérobies réduisant définitivement le rouge neutre, mais non la safranine $rH_2 < 3,1$
- 4°) Anaérobies réduisant temporairement le rouge neutre $rH_2 > 3,1$
- 5°) Anaérobies réduisant temporairement la phénosafranine et non le rouge neutre $3,1 < rH_2 < 5,8$
- 6°) Anaérobies ne réduisant pas la phénosafranine $rH_2 > 5,8$
Cl. botulinum C.

Or, voici les résultats obtenus avec nos bouillons de viande-foie papainés, excellents milieux de culture pour *Clostridium* et *Spherophorus*, anaérobies classés par les anaérobies stricts:

S u b s t r a t	pH	rH ₂	Potentiel red-ox
1) Viande-papaine	6,8		+320mV
2) Viande-Foie de veau-papaine	6,9		+330mV
3) Bouillon de foie	6,88		+310mV
4) Bouillon-Papaine succinate	6,92		+260mV

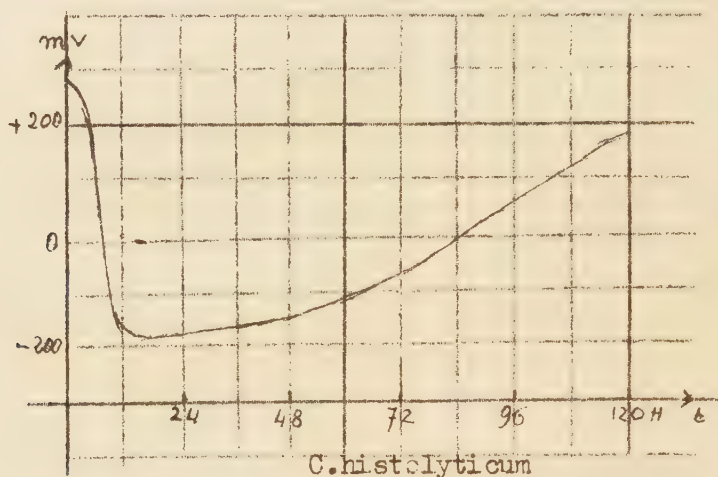
Pour simplifier les milieux et obtenir une préparation très rapide de substrats pour anaérobies, nous avons, avec GEYER (46) préparé des milieux à base de divers hydrolysats commerciaux.

Après stérilisation, puis ensemencement par *C.histoliticum* (souche 1 de Pasteur) nous avons obtenu les chiffres potentiométriques suivants:

S u b s t r a t	pH avant	Potentiel avant	pH après	Potentiel après 48 h.
I- Protéolysat de Ronchèse 2 g Glucose 0,20 Succinate de Na 0,25 Eau q.s.p. 100 ml	7,60	+230mV	7,65	-25mV
II- Protéolysat de Ronchèse 4 g Glucose 0,20 Succinate de Na 0,25 Eau q.s.p. 100 ml	7,90	+210mV	7,80	-80mV
III- Protéolysat de Ronchèse 5 g Glucose 0,20 Succinate de Na 0,25 Eau q.s.p. 100 ml	7,50	+170mV	7,52	-80mV
IV- Protéolysat médial 10 g - caséiné-malt Glucose 2 g Succinate de Na 0,50 Eau q.s.p. 100 ml	4,8 4,9 5,6 6,5 7,39	+520mV +480mV +450mV +390mV +320mV	7,41	-30mV
V - Protéolysat de Ronchèse 4 g Glucose 0,20 Succinate de Na 0,05 Eau q.s.p. 100 ml	7,0	+180mV	7,0 " " " "	après 12 h. -180mV après 36 h. -150mV après 60 h. -130mV après 84 h. -10mV après 108 h. +70mV après 132 h. +190mV

P.S.- Tous ces substrats (I à V) ont été stérilisés.

Le substrat V s'est avéré un excellent milieu de culture du *Cl. histolyticum*. Il nous a permis de suivre les variations du potentiel d'oxydo-réduction mesuré par potentiométrie, pendant six jours consécutifs.



Par potentiométrie

A la suite de cette constatation, nous essayâmes l'extraction et la caractérisation de l'acide succinique ou fumarique dans le protéolysat de Ronchèse. Cette recherche, par notre méthode, utilisant la réaction de ROSENTHALER, s'est avérée fort positive et le taux de substances donnant la réaction, exprimé en acide succinique, oscille autour de 0,500 g. par kilog de poudre anhydre.

Peu de temps après, quelques publications vinrent corroborer exactement nos résultats. C'est ainsi que SARTORY, MALGRAS, TOUILLIER et WESCHAMBERE (98) obtinrent eux aussi des cultures d'anaérobies stricts sur des milieux d'hydrolysats protidiques.

A peu près à la même époque, Madame GRUNBERG-MANAGO (58) rappelait les potentiels limites supérieurs retenus par divers auteurs pour la culture des anaérobies stricts:

AUBEL, AUBERTIN, GENEVOIS	+35mV	à pH = 7,5	
FILDES et KNIGHT	+110mV	à pH = 7	(tétanique)
PLOTZ et GELOSO	+32mV	à pH = 7	(tétanique)
KANEL	+180mV	à pH = 7	
KLIGER et GUGGENHEIM	-125mV	à pH = 7	
HANKE et KATZ	+150mV	à pH = 6,6	(B. vulgatus)
MESSING	+200mV		
BACK et BURROUS	-100mV		
BROCH-KAHN, MIRSKY	(?)	un potentiel relativement haut.	

tandis que KNAYSI et DUTKY arrivent à faire croître *C. butanol* jusqu'à +335mV en présence de ferriocyanure de K.

La moyenne du potentiel de départ de nos cinq milieux se situe à +220mV à pH = 7,35, chiffre qui n'est pas éloigné de ceux de nos auteurs précédents. Dans ces conditions, il semble difficile de retenir la nécessité de potentiels fortement négatifs, de rH_2 nuls (c'est-à-dire quand de l'hydrogène se dégage) pour obtenir la croissance des anaérobies stricts.

Dans les milieux limpides, dans les solutions d'électrolytes où la phase liquide est rigoureusement homogène, les potentiels d'oxydo-réduction obtenus par colorimétrie diffèrent peu de ceux lus au potentiomètre. Au contraire, la papaine et les hydrolysats papainiques ne donnent pas de solutions vraies, mais avant tout une solution colloïdale et les micro-organismes qu'on yensemence augmentent d'autant plus le caractère hétérogène du milieu que cette croissance est plus active.

Avec le bleu de méthylène, et surtout avec le vert de Janus, le colorant est presque régulièrement adsorbé sur les micelles du colloïde et les microbes, ceux-ci finissant toujours par se rassembler au fond des tubes. Les résultats colorimétriques diffèrent de ceux lus avec l'électrode de platine, car cette dernière n'indique que le potentiel de la phase liquide, alors que les colorants adsorbés par les cellules du germe, indiquent davantage le degré de la réduction au contact immédiat des protoplasmes microbiens; d'où les chiffres plus bas fournis par les colorants par rapport à la potentiométrie.

RESUME DES CHAPITRES VII à X

- 1°) Le pouvoir antibiotique de la papaine est renforcé par l'existence de substances réductrices dans les hydrolysats papainiques.
Cette présence est démontrée par le virage d'indicateurs d'oxydo-réduction.
- 2°) D'autre part, la papaine apparaît comme facteur de croissance des anaérobies.
- 3°) En essayant de caractériser directement les réducteurs glutathion, cystéine, cystine, acide ascorbique, thréonine, nous ne pûmes pas confirmer le rôle prédominant de ces molécules dans ce processus biologique.
- 4°) Par addition d'hydroxyméthylglyoxal, de thioacétates et, enfin, de succinate de soude, nous pûmes accroître considérablement l'activité des milieux favorables à la culture des anaérobies; dans ces conditions, celui de l'acide fumarique est nul.
- 5°) Les méthodes analytiques quantitatives ne permettent pas de différencier l'acide succinique de l'acide fumarique. Toutefois, les hydrolysats papainiques présentent une réaction d'identité commune à ces deux acides, ce qui nous a permis un dosage colorimétrique global.
- 6°) Une confirmation microbiologique du rôle des réducteurs est apportée par la comparaison de l'activité d'enzymes microbiens et de la papaine sur les collagènes : la papaine est une collagénase, propriété qui n'appartient qu'aux enzymes des microbes anaérobies stricts.
- 7°) Nous terminons par une dissociation entre nos résultats colorimétriques et potentiométriques et démontrons que la présence des réducteurs dans les substrats pour anaérobies est plus importante que l'absence d'oxygène et l'anoxyciose.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Dans la première partie de notre travail concernant la papaine enzyme, nous nous sommes attaché, après une revue historique rapide, à élucider quelques points essentiels.

1°) Nous avons procédé à une étude critique des différentes méthodes de détermination de l'activité protidolytique de la papaine, notamment de la méthode officielle du Codex, à la suite de laquelle nous proposons une méthode de titrage basée sur le pouvoir rotatoire de l'hydrolysat papainique de la fibrine.

2°) Nous avons défini ce qu'on entend par papaine, puis donné une composition de l'enzyme industriel et exposé nos essais de cristallisation, étude au microscope et au microscope électronique des cristaux, examen électrophorétique et chromatographique de l'enzyme, ce qui nous a permis d'émettre une première hypothèse sur le mode d'action éventuel de l'enzyme sur le substrat.

3°) Nous avons étudié l'intervention de différents facteurs, notamment le pH (avec son optimum d'action sur différents substrats, sa variation au cours de l'hydrolyse de la gélatine en milieu tamponné, ses variations ainsi que celles du potentiel d'oxydo-réduction au cours d'une hydrolyse prolongée de plusieurs substrats en absence de tampons), la température (fixation de l'optimum thermique de l'hydrolyse de différents substrats), enfin, l'identification de quelques molécules libérées par la protidolyse papainique.

Dans la seconde partie, nous avons envisagé l'action de la papaine sur la croissance microbienne.

1°) Elle peut se comporter comme antibiotique:

- a) Nous avons démontré que la papaine agit comme antibiotique vis-à-vis de certains germes, notamment d'aérobies.

- b) Le pouvoir antibiotique est accru par adsorption et dialyse, mais pas par cristallisation à l'air, du fait que ce pouvoir est détruit irréversiblement par oxydation.

En essayant d'accroître ce pouvoir par action du chlore, de l'acide nitrique, du sulfate diméthylque, nous n'avons enregistré que des échecs.

- c) Après divers essais concernant le mécanisme possible de l'action de l'antibiotique, nous arrivons à montrer que la respiration et l'activité décarboxylasique ne sont pas modifiées par addition de l'enzyme, mais, à l'aide du germe l'entérocoque, et pour ce germe, que la papaine semble bloquer l'acide glutamique ou un système enzymatique où intervient l'acide glutamique.

- d) En étudiant les potentiels d'oxydo-réduction des solutions de papaine par les indicateurs, on constate qu'ils restent bas.

Les chiffres également bas sont maintenus dans les cultures de staphylocoques inhibés par la papaine. On démontre ainsi le rôle possible des réducteurs pour renforcer l'action antibiotique.

2°) Inversement, et pour la même raison, la papaine et les hydrolysats papainiques s'avèrent favorables à la culture des anaérobies, ce qui est confirmé par la culture rapide de B.subtilis et de différents Clostridium.

- a) Après diverses recherches, le rôle prédominant du succinate de sodium est mis en évidence dans les hydrolysats.
- b) Ces diverses acquisitions nous permettent, tout en dissociant les résultats des potentiels d'oxydo-réduction obtenus, d'une part par voie colorimétrique, de ceux obtenus d'autre part, par voie potentiométrique, une conception nouvelle sur l'anaérobiose puisqu'en choisissant convenablement un substrat suffisamment réducteur, on peut cultiver, en présence d'air, des microbes réputés spécifiquement anaérobies.

La notion de substrats réducteurs semble devoir l'emporter sur la conception de la vie sans air.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ABRIBAT (M) C.R. Acad. Sc. 1939, T.209, p.244 .
- 2 - ANSON (M.L.) Advances in protein chemistry 1948, vol.4
p.127
- 3 - ASTRUC (A) Traité de Pharmacie Galénique, 1re éd. Maloine
Paris 1921.
- 4 - BABIN (R), DELMON (G), BLANQUET (P)
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, déco. 1953 .
- 5 - BABIN (R), BRISOU (J), RIGAUD (A) Ann. Inst.Pasteur 1950, t.79, p.331
- 6 - BABIN (R), BRISOU (J), RIGAUD (A) C.R.Soc. Fr. Microbiol. 1949, 6.
- 7 - BABIN (R) Bull. Soc. Pharm. Bordx, 1953, p.173.
- 8 - BABIN (R), MORETTI (G), RIVES (M) C.R.Soc.Biol. 1947, 141, p.894.
- 9 - BACQ (M), DESREUX (V) Exp. ann. Biochim. Méd. 1948, Xme série p.78.
- 10 - BALLS (A.K.), HOOVER (S.R.) J. Biol. Chem. 1937, 121, 737.
- 11 - BALLS (A.K.), LINEWEAVER (H.) Science, 1937, 86, 379.
- 12 - BALLS (A.K.), LINEWEAVER (H), THOMPSON (R.R.) J.Biol.Chem. 1939, 130,
669.
- 13 - BASU (K.P.), NATH (M.C.) J. Indian. Chem. Soc. 1936, 13, 34.
- 14 - BERGMANN (M), ROSS (W.F.) J. Biol. Chem. 1935, 111, 657.
- 15 - BERGMANN (M), ZERVAS (L), FRUTON (J.S.) J.Biol. Chem. 1935, 111, 225.
- 16 - BERSIN (T) Ergeb. Enzymforschung. 1935, 4, 82.
- 17 - BINET (L), WELLER (G) Bull. Soc. Chim. Biol. 1934, 16, p.1284.
- 18 - BOULANGER (P) Exp. Ann. Biochim. Méd. 1951, XIIme Série
p.179.
- 19 - BOULANGER (P), BISERTE (G) Exp. Ann. Biochim, Méd. 1950, XIme Série
p.82.
- 20 - BOULANGER (P), Exp.Ann. Biochim. Méd. 1951, XIIIIme série, p.133
- 21 - BREWER (C.M.) Ann. Public. Health, 1942, 32, 401-405.
- 22 - BRISOU (J), BABIN (R) C.R. Sol. Biol. 1950, 144, 1166.
- 23 - BRISOU (J), MILHADE (J) Bull. Soc. Chim. Biol. 1951, 33, p.64.
- 24 - CARPENI (G) in LOISELEUR, Loc. Cit.
- 25 - CHARLOT (G), BALIER (D) Méthodes modernes d'analyse quantitative
minérale 2me éd. Masson, Paris, 1949, p.42.
- 26 - CHEVALY Synthèse Ecole Sup. Pharmacie Montpellier 1883.
- 27 - CHOAY Thèse Doct. Pharm. Paris 1911, p.66 .
- 28 - CLARK (W.M.), WURMSER (R) in LOISELEUR, loc. cit. p.105.
- 29 - CLUTTERBUCK (P.W.) J. Pharm. Chim. 1929, 1, p.219.
- 30 - DELAUNAY (M) Ann. Inst. Pasteur, 1949, 76, 16,
1949, 77, 220.

- 31 - DROUHET (E), KAPES (A) Ann. Inst. Pasteur, 1949, 76, 168.
- 32 - DUFRÉNOY (J), PRATT (R) J. Bactériol. 1948, 54, 317, 283.
- 33 - DUMAS (J), BORDET (P), LAPORTE (R), LEPINE (P), ROCHON (J), PREVOT (A.R)
Bactér. Médicale, Flammarion, Paris 1951.
- 34 - EFFRONT (J) Les Catalyseurs biochimiques dans la vie et
dans l'Industrie, Paris 1914.
- 35 - EPES (H) Biochem. J., 1945, 39, p.43.
- 36 - FABRE (R), FROSSARD (R) J. Pharm. Chim. 1925, 31, p.472-478.
- 37 - FERNBACH (A) C.R. Acad. Sc., 1906, 142, 285.
- 38 - FLEURY (P) Bull. Soc. Chim. Biol. 1924, t.VI, p.536-583.
- 39 - FLORENCE (G) Précis de Chimie Biologique et Médicale,
1re éd. Maloine Paris 1944, p.471.
- 40 - FLORENCE (G), ENSEIME (J) Précis de Chimie Biologique et Médicale,
2me éd. Maloine Paris 1950.
- 41 - FRANKEL (Em), J. Biol. Chem. 1917, XXXI, p.201-215.
- 42 - FRUTON (J.S) Ann. Rev. Biochem. 1947, 17ter, 16, 35.
- 43 - FRUT (J.S.) Symposium sur la Biogénèse des protéines,
IIème Congrès Intern. Biochim, Paris 1952,
Ed. SEDES p.15
- 44 - GALE (E.F), TAYLOR (E.S.) Nature, 1946, 157, 549, 550.
- 45 - GALE (E.F), J. Gen. Microb. 1947, I.
- 46 - GEYER (A), BABIN (R) Bull. Soc. Pharm. Bordx. Paraïtra janv. 1954.
- 47 - GORIS (A), LIOT (A), JANOT (M.M.), GORIS (A) Pharmacie Galénique
Masson, Paris, 1949.
- 48 - GRUNBERG-MANAGO (M) Bull. Soc. Chim. Biol? 1951, n°7, p.646.
- 49 - GRUTZNER in. GORIS, LIOT, JANOT, GORIS.
- 50 - GUILLEMET (R), PEYNAUD (E), in thèse PEYNAUD loc. cit.
- 51 - HEWITT (L.F.) London County Council 1936, p.57.
- 52 - HOOVER (S), KOKES (E) J. Biol. Chem. 1947, 167, p.199-209.
- 53 - HOUSEWRIGHT (R.D.), HENRY (R.J.) J. Biol. Chem. 1947, 167, p.553.
- 54 - HUGUES (G.) in Dictionnaire encyclopédique des Sciences Médicales,
Asselin et Masson, Paris, 1884, p.419.
- 55 - IRVING (G.W.) FRUTON (J.S.), BERGMANN (M) J. Biol. Chem. 1941, 139
569.
- 56 - JANSEN (E.F.), BALLS (A.K.) J. Biol. Chem. 1941, 137, 459.
- 57 - JAULMES (Ch.), JUDE (A), QUERANGAL des ESSARDS (J.)
Pratique du Laboratoire, Masson 1951.
- 58 - JAVILLIER (M) Thèse de Concours d'Agrégation, Ec. Pharmacie
Paris, 1909.
- 59 - KILMER Story of papaw. Am. J. Philadelphie 1901,
LXXIII, 272, p.336-383.
- 60 - KRAMPITZ (L.O), WERKMANN (C.H.) Arch. Biochem. 1947, 12, 57.
- 61 - KRAUT (H), BAUER (E) Z. Physiol. Chem. 1927, 164, 10, p.103-136.
- 62 - L'ANGLYKKE (A.F), SMYTHE (C.V), PERIMAN (D) In Enzymes SUMMER and
MYRBACH Acad. Press. N.York 1951, vol.2
part. II, p. 1312.
- 63 - LEBEAU (P), COURTOIS (G) Traité de Pharmacie Chimique, 3me Ed.
Masson Paris 1947.
- 64 - LESPAIGNOL (A) Pharmacie Chimique, Vigot Fr. Paris, 19.
- 65 - LEUTHARDT (F) Exp. Ann. Biochim. Méd. 1948, XIII sér. p.7.

- 66 - LINDERSTROM-LANG (K) Bull. Soc. Chim. Biol. 1953, T. XXXV, p. 100
- 67 - LOISELEUR (J.) Techniques de Laboratoire Masson, Paris 1947.
- 68 - MACHEBOEUF (M) Bull. Soc. Biol. 1948, n°3-4.
- 69 - MACHEBOEUF (M), CACHIN (M), BLASS (J), Annal. Biol. Clin. 1.2/1952.
- 70 - MACHEBOEUF (F), GROS (F) Exp. Ann. Biochim. Méd. 1951, p. 141.
- 71 - MAC FARLANE (M.G.), MAC LENNAN (J.O.) Lancet. Sept. 1945, p. 328.
- 72 - MAQUENNE (L), in GORIS, LIOT, J. NOT, GORIS et C.R.A., 1905, 140, 1303.
- 73 - MATHIEU (H) Manuel d'Analyse Chimique Volumétrique
Masson Paris 1942, 2me éd.
- 74 - MENDEL (L.B.), BLOOD (L.F.) J. Biol. Chem. 1910, 8, 177, 213.
- 75 - MESNARD (P), BABIN (R) Bull. Soc. Pharm. Bordx. déc. 1953.
- 76 - MESNARD (P), Mlle FIERMAIN (A) Bull. Soc. Pharm. Bordx 1952, p. 193.
- 77 - METT. In Diagnostics Biologiques FIESSINGER (N), OLIVIER (H.R.)
HERBAIN (M) Maloine, Paris 1944, p. 263.
- 78 - NORTHROP (J.H.) J. Gen. Physiol. 1932, 16. 53 et 1932, 16, 319.
- 79 - PECKOLT. in Précis de Matière Médicale de PLANCHON (L), BRETIN (P)
MANCEAU (P), Maloine 1937, p. 1010.
- 80 - PENNANEACH (J), MORAND (P), GUENNEC (J.V) Revue de Dém. Navale
1950, p. 63.
- 81 - PERROT (E.M.) Matières Premières du Règne Végétal, Masson
1943, t. II, p. 1622.
- 82 - PEYNAUD (E) Thèse Doctorat es Sciences Bordx (Ing. Doc)
1946.
- 83 - POLONOVSKI (M), BOULANGER (P), MACHEBOEUF (M), ROCHE (J), SANNIE (C)
Biochimie Médicale, Masson 1952.
- 84 - POLONOVSKI (M) Exp. Ann. de Biochim. Méd. 1942, III s., p. 51.
- 85 - POPE (C.G.) Brit. J. Expl. Path. 1938, 19, 245, et
1939, 20, 132.
- 86 - POZERSKI de POMIANE (E) Thèse Fac. Sc. Paris, 1908.
- 87 - PRATT (R), DUFRENOY (J) Bact. Rev. 1948, 12.
- 88 - PREVOT (A.R) in Bactériologie Médicale, loc cit. (33).
- 89 - PREVOT (A.R), REINERT (C) C.R. Soc. Biol. 1942, 136, 288.
- 90 - RAMON (G) Presse Médicale 1944, 52, 249.
- 91 - REISS (P) in P. THOMAS, Manuel de biochimie 2me Ed. Masson Paris p. 206.
- 92 - RIGAUD (A), BABIN (R), BRISOU (J), C.R. Soc. Biol. 1949, 143.
- 93 - ROBERT Synthèse, Montpellier 1884.
- 94 - ROCHE (J) Exp. Ann. Biochim. Méd. 1946, p. 93.
- 95 - ROCHE (J), MOURGUE (M) Bull. Soc. Chim. Biol. 1943, 25, 1347.
- 96 - ROSENTHALER (L) in P. THOMAS, loc. cit.
- 97 - SANNIE (Ch.) Exp. Ann. Biochim. Méd. 1946, VIme Série p. 225.
- 98 - SARTORY (R), MAILGRAS (J), TOUILLIER (J), VESCHAMBERE (R),
Ann. Inst. Pasteur, 1951, 81, n. 1.7.
- 99 - SCHOBERT (A), HAMM (A) Biochem 1948, 318, 331-65.
- 100 - SPEYER (L) Arzneimitt. Forschung. 1953, 267, 318.
- 101 - SULLIVAN (M.X.), HESS (X.C.), HOWARD (W.H.) J. Biol. Chem. 1942, 145, 621.
- 102 - SUMNER (J.B.), KIRK (J.S.), HOWELL (S.F.) J. Biol. Chem. 1932, 98, 543.
- 103 - TAYEAU (F), BUFFE (M) C.R. Soc. Biol. 1946, 140, 508, 65.
- 104 - TROUETTE-PERRET Thèse Pharmacie Paris 1880.
- 105 - THOMAS (P) Manuel de Biochimie 2me Ed. Masson Paris 1946.
- 106 - VAN SLYKE (D), FOLCH (J), J. Biol. Chem 1940, n°2, p. 512.

- 107 - VAUQUELIN in Traité de Botanique Médicale BAILLON (H)
Hachette, Paris 1884, p.834.
- 108 - VELIUZ (L) C.R. Biol. 1938, II p.132.
- 109 - VINES (S.H.) Ann. de Botanique 1903, 17 - 602 .
- 110 - WAKSMAN (S.A.) Antagonismes microbiens et substances micro-
biennes Sedes, Paris 1948.
111. - WILLSTÄTTER (R), GRASSMANN (W) Z.physiol. Chem. 1924, 138
p.184-215
- 112 - WILLSTÄTTER (R), in BAMANN, MYRBACK, loc. cit.
- 113 - WINNICK (T) J. Biol. Chem. 1944, 152, 465, 25-27 .
- 114 - WITTMARCK in GORIS, LIOT, JANOT, GORIS, loc.cit.
- 115 - WULFF (P) in BAMANN (E), MYRBACK (K), Die methoden der
Fermentforschung. Thieme, Leipzig, 1941,
p.927.
- 116 - WURMSER (A) Energetique des Réactions Biochimiques. Les
Cours de la Sorbonne. Tournier et Constans
G.D.V. Paris.
- 117 - WURMSER (R), in PREVOT (A.R.) Ann. Inst. Pasteur 1948, 75, 77.
- 118 - WURTZ (F) C.R. Ac. Sc. 180, 91, 787.
- 119 - WURTZ (F), BOUCHUT Recherches cliniques et chimiques sur la
papaine ou pepsine végétale tirée du C.papaya
Paris, Baillière 1879 et in Baillon (H),
p.834, loc.cit.
-

DEUXIEME THESE

PROPOSITION DONNEE PAR LA FACULTE

LA NOTATION PK

Bordeaux, le 30 novembre 1953

Le Président,

Signé: P. MESNARD

Vu, Bordeaux, le 2/12/1953

Le DOYEN

Pour le Doyen,
L'ASSESEUR,

Signé: SIGALAS

Vu et permis d'imprimer

Bordeaux, le 4 décembre 1953,

Le RECTEUR,

Signé : DELAGE

